

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2002-533695
(P2002-533695A)

(43) 公表日 平成14年10月8日 (2002.10.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 1/28		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 5 2
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/48	P 2 H 0 5 2
C 1 2 Q 1/68		33/53	M 4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/48		33/566	4 B 0 2 9
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 77 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-590782(P2000-590782)
(86) (22) 出願日 平成11年12月22日 (1999.12.22)
(85) 翻訳文提出日 平成13年6月25日 (2001.6.25)
(86) 国際出願番号 PCT/US99/30519
(87) 国際公開番号 WO00/38838
(87) 国際公開日 平成12年7月6日 (2000.7.6)
(31) 優先権主張番号 09/219,443
(32) 優先日 平成10年12月23日 (1998.12.23)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

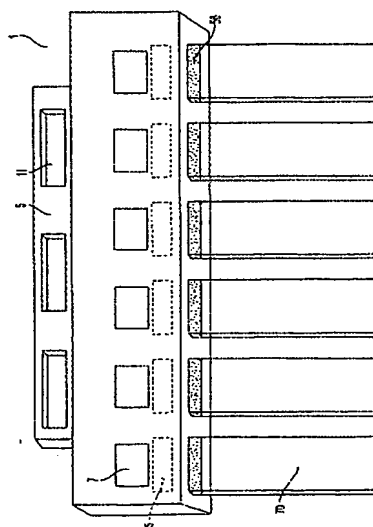
(71) 出願人 アメリカン・レジストリー・オブ・パソロジー
AMERICAN REGISTRY OF PATHOLOGY
アメリカ合衆国20306-6000ワシントン・
ディストリクト・オブ・コロンビア、アー
ムド・フォーシーズ・インスティテュー
ト・オブ・パソロジー
(72) 発明者 ウェーシン・チュ
アメリカ合衆国20904メリーランド州シル
バー・スプリング、モンクレア・ドライブ
12503番
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スライド上で生物学的試料を効率的に処理する装置および方法

(57) 【要約】

顕微鏡スライド(70)上の生物学的サンプルの処理方法を記述する。本発明の一態様は、その上にスライドを配置したトレイ(90)上のウェル(24)中で前乾燥した試薬を使用すること、特に、逐次的に溶解する前乾燥した複数試薬を使用することである。本発明の他の態様は、アッセイする生物学的サンプルと併せて、顕微鏡スライド(70)上に直接配置した外部対照(230)を使用することである。外部対照(230)を、スライドに貼り付け得る膜上に、都合良いように配置することができる。本発明のさらなる態様は、単一スライド上で、細胞サンプルの全染色体の全体染色体彩色を可能とするように、特別に設計されたトレイ(90)である。本発明は、スライド(70)に対向してに配置し緩衝液で満たした場合に反応チャンバーとして役立つ、凹形ウェル群を有するカバースリップ(500)も示す。好ましくは、試薬をウェル(24)内で前乾燥する。本発明のさらなる態様は、表面に前乾燥した試薬を有するカバースリップ(500)と一緒に、複数のスライド(70)を反応チャンバー(280)内に配置して、それらの上でサンプルを反応させる方法



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的試料を試薬群で処理する方法であって：

- (a) 該生物学的試料を顕微鏡スライド上にマウントする段階、
 - (b) 該顕微鏡スライドをスライドホルダー中に装着する段階、但し該スライドホルダーは複数のスライドを保持し得るものである、
 - (c) トレイ上のウェル内で少なくとも1種の試薬を予乾燥する段階、
 - (d) 該スライドホルダー内の該顕微鏡スライドを該ウェルの上方に置き、該生物学的試料が該ウェル内の試薬と接触可能にする段階、および、
 - (e) 水または緩衝液を該ウェルに加え該試薬群を溶解させる段階、
- の各段階を含んでなる方法。

【請求項2】 該ウェル内で1以上の試薬を予乾燥し、かつ、該1以上の試薬が水または緩衝液の添加により溶解する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 試薬群を、作用順とは逆順に配列して乾燥させる、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 該試薬群が不活性材料で相互に分離されている、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 スライド上の生物学的試料をアッセイする方法であって、該スライド上に1またはそれ以上の外部対照が置かれてあり、該生物学的試料について1またはそれ以上の上記段階を同時に処理する方法。

【請求項6】 該外部対照が、該スライド上に置いた膜上にある、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 該スライドが、該生物学的試料と反応する1またはそれ以上の試薬を含有するウェル上に置かれる、請求項5に記載の方法。

【請求項8】 生物学的試料と外部対照とを含んでなるスライド。

【請求項9】 複数の対照物質を含んでなる膜。

【請求項10】 該対照物質が、抗原、ペプチド、タンパク質、核酸および細胞からなる群から選択される、請求項9に記載の膜。

【請求項11】 該膜が、該膜の第1面上に上記外部対照を、そして該膜の第2面上にスライドと接触したとき該膜を該スライドに付着させる物質を含む、

請求項9に記載の膜。

【請求項12】 該膜がスライドに付着している、請求項9に記載の膜。

【請求項13】 請求項9に記載の膜を、多数ウエルのトレイと組合わせて含んでなるキット。

【請求項14】 該多数ウエルトレイが、予乾燥した試薬類を含むものである、請求項13に記載のキット。

【請求項15】 該多数ウエルトレイのウエルに加えた試薬が、該膜上の対照物質と反応するものである、請求項13に記載のキット。

【請求項16】 該ウエルが、生物学的試料のアッセイに使用しようとする試薬を含んでおり、該試薬は該アッセイの実施に先立って該ウエル内で乾燥させてある、ウエルを含んでなるトレイ。

【請求項17】 1またはそれ以上の試薬を該ウエル内で乾燥させてある、請求項16に記載のトレイ。

【請求項18】 異なる試薬群が、水または緩衝液を該ウエルに加えた後、そこで最初に作用する試薬が2番目に作用する試薬の溶解に先立って溶解するように、順番に溶解してゆくような様式で、該ウエル内で乾燥させてある、請求項17に記載のトレイ。

【請求項19】 該試薬群が不活性層で相互に分離されている、請求項18に記載のトレイ。

【請求項20】 該カバースリップの一部が凹面であり、顕微鏡スライド上に置いたとき既知容積を囲みこむようになる、顕微鏡スライド用カバースリップ。

【請求項21】 さらにその中に乾燥させた試薬群を含有する、請求項20に記載のカバースリップ。

【請求項22】 請求項20に記載のカバースリップ、顕微鏡スライド、および該カバースリップの一部と該顕微鏡スライドとの間に挟み込まれた挿入物の組合わせ。

【請求項23】 該挿入物が対照試料を含むものである、請求項22に記載の組合わせ。

【請求項24】 該カバースリップが、バーコードまたはテキストで標識されている、請求項20に記載のカバースリップ。

【請求項25】 生物学的試料について顕微鏡スライド上でアッセイを実施する方法であって：

- (a) 生物学的試料を顕微鏡スライド上に置く段階、
 - (b) 該顕微鏡スライド上に請求項20に記載のカバースリップを置く段階、
 - (c) 水、緩衝液または試薬を、該顕微鏡スライドと該カバースリップとの間の既知容積内に流入させる段階、および、
 - (d) 反応を生起させる段階、
- の各段階を含んでなる方法。

【請求項26】 該カバースリップがその上に予乾燥した試薬を含むものである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 生物学的試料について顕微鏡スライド上でアッセイを実施する方法であって：

- (a) 生物学的試料を顕微鏡スライド上に置く段階、
 - (b) 段階(a)の該顕微鏡スライドを、処理するために反応室内に入れる段階、
 - (c) カバースリップを該反応室内に入れる段階、および、
 - (d) 反応を生起させる段階、
- の各段階を含んでなる方法。

【請求項28】 該カバースリップが、該カバースリップを該反応室内に入れるに先立って、その中に乾燥した試薬を含むものである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 該カバースリップが、該反応を生起させるに先立って、その上に置かれた対照試料を含むものである、請求項27に記載の方法。

【請求項30】 該カバースリップが、バーコードまたはテキストを含むものである、請求項27に記載の方法。

【請求項31】 該装置の各反応室内への1またはそれ以上の流入口および1またはそれ以上の流出口を含んでなる、多数反応室装置。

【請求項32】 加熱用ブロックと組み合わせた、請求項31に記載の多数反応室装置。

【請求項33】 管部が該流入口へのポンプと連結している該ポンプと組み合わせた、請求項31に記載の多数反応室装置。

【請求項34】 該ポンプを制御する中央処理ユニットと組合わせた、請求項33に記載の多数反応室装置。

【請求項35】 該装置の1またはそれ以上の反応室内の空間容積を変える手段と組み合わせた、請求項31に記載の多数反応室装置。

【請求項36】 該手段が中央処理ユニットを含むものである、請求項35に記載の多数反応室装置。

【請求項37】 生物学的試料について、in situ 核酸増幅と組合わせてin situ ハイブリダイゼーションを実施する方法であって、
該生物学的試料を、核酸増幅を実施するための試薬群を含有する溶液と接触させ、必要なら該溶液を核酸増幅の生起に十分な熱循環させ、次いで該生物学的試料をin situ ハイブリダイゼーションのために分析し、さらに該溶液の試料を増幅させた核酸について分析すること、を含む方法。

【請求項38】 試薬を有するスライド上で生物学的試料を処理する方法であって、

- i) 該試薬がフィルターペーパーの切片上に被覆してあり、そして、
- ii) 該スライド上の該生物学的試料を該フィルターペーパーと接触するように置く、方法。

【請求項39】 スライドに接触させるトレイであって、該トレイが多数のウエルを含むものであり、各ウエルが該スライドの一部とのみ接触しており、かつ各ウエルが隙間または溝により隣接ウエル群と分離されている、トレイ。

【請求項40】 請求項39に記載のトレイを使用する、in situ ハイブリダイゼーション実施方法。

【請求項41】 核酸プローブを該トレイのウエル内で予乾燥してある、請求項40に記載の方法。

【請求項42】 該スライドが、該スライド上に予めアレンジしてある対照

(6)

特表2002-533695

核酸を含むものである、請求項40に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

本発明は、多様な目的のためにスライド上で生物学的試料を処理する装置に関する。生物学的試料は多くの目的のために異種多様なアッセイを用いて分析される。病理学者はしばしば生物学的試料を分析するために組織化学または免疫細胞化学を用い、分子生物学者は生物学的試料などにin situハイブリダイゼーションまたはin situポリメラーゼ連鎖反応法を行うことがある。分析される試料はしばしば、パラフィン中に埋め込まれて顕微鏡スライドに取り付けられる。

【0002】

アッセイは通常、抗体、酵素および他の高価な試薬の使用を伴うので、試薬の使用量を最小にしてコストを下げるのが望ましい。現在いくつかの自動化システム（例えば、Ventana ESIHC Staining System, the Shandon Lipshaw Cadenza Automated Immunostainer; 参照、Brigati et al. (1988)）があるが、これらのアッセイはまた非常に労働集約的である。本発明の背景を説明し、実施に関するさらなる詳細を提供するために、本明細書に用いられる公報および他の文献を出典明示により本明細書の一部とし、便宜上、付属の参考文献リストに各々まとめた。大部分の自動化システムは1回の運転で40～48のスライドを操作し得るだけである。Fisher自動化システムは1回の運転で120のスライドを操作し得る。免疫細胞化学を行うだけの大部分の自動化システムは、脱パラフィン処理（deparaffinize）、組織化学（例えばヘマトキシリンおよびエオシン染色）およびカバースリップ取付けを行わないので、結果としてこれらは手作業により別々に行われなければならない、時間および労働集約的である。自動化システムは、スライドを準備し、分析する全工程のごく一部を行うにすぎない。自動化部分の前に依然手作業で行われる段階には、ケースおよびスライドの分類、スライドの標識化、自動化装備のプログラミング、毎日の抗体および試薬の製造、スライドに取り付けられる対照組織の製造およびマイクロ波抗原回復が含まれる。自動化段階後に依然手作業で行われる処理は、脱水、カバースリップ取付け、スライド標識化およびスライドとケースの分類である。さらに、多くの市販の既製試薬は、

特別に設計された試薬の使用を必要とする自動化システムには適していない。多数の試料を処理する製造所は、これらの自動化システムの購入に関連する高いコストおよびアッセイを行うための使い捨て付属品および試薬の使用に関連する高いコストの支払いをいとわないであろうが、中小規模の製造所は、手作業により試料を処理しつづけるほうがより費用効果が高い。

【0003】

典型的な免疫細胞化学アッセイは一連の多くの段階を要する。これらには：生検標本 (biopsy) からなどの生物学的試料を得ること、試料をホルマリン固定すること、試料を一夜処理すること、試料をパラフィンに埋め込むこと、連続切片を切り出して顕微鏡スライドに取り付けることおよび乾燥させることが含まれる。これらの段階の後に脱パラフィン処理 (deparaffinize) する (キシレン、エタノールおよび水における処理) 段階が続き、最後にスライドに取り付けられた試料において反応が行われ得る。典型的には、酵素、一次抗体、二次抗体、検出試薬、色素原、対比染色などの試薬類を含む一連の溶液を、スライドに滴下し、インキュベートして、洗浄する。最後に試料を顕微鏡下で観察し得る。明らかに多くの個別の段階が必要とされ、スライド上の各試料は個別に処理されなければならない。さらに非常に労働集約的であるので、顕微鏡スライド上に取り付けられた試料の上部に溶液を単に滴下する通常的使用方法には欠点がある。溶液は生物学的試料そのものの領域に単に制限されず、溶液は薄い層というより比較的深い層であり得る。これらの特徴は、非常に高価な試薬の余分な使用を必要とする。試料を長時間インキュベートしなければならない場合、溶液をスライド上に置いて、空気中に開放すると、蒸発がおり得る。蒸発により試薬の濃縮または乾燥が引き起こされ、高濃度は明らかに望ましくない背景レベルの増加をもたらす得る。溶液が全体的に蒸発する場合、アッセイは失敗する。カバーを有する湿室で試料をインキュベートすると蒸発の問題は防ぎ得るが、湿室のカバー上で液化する水滴がスライド上に落下することもあるのでアッセイが台無しとなる。

【0004】

ハイコストの自動化システムを用いずに、いくつかの試料を一度により迅速にアッセイする改良方法は、中小規模の製造所にとって喜ばしいものである。さら

に、試薬の使用をより少量にし、大気中に開放されたスライド上の試料を処理することに関する欠点を克服する方法は、喜ばしい進歩となる。

【0005】

(発明の要約)

本発明は、顕微鏡スライド上に取り付けた（マウントした）生物学的試料についてアッセイを行う装置および方法に関する。この装置および／または方法の使用は、アッセイをより迅速および好都合に行うのに役立つ。本発明の一態様は、試薬をトレイの複数ウェル内で予乾燥して使用することであり、それによって単にアッセイ時にウェルに水または緩衝液を添加するだけでよく、試薬を添加する必要がないようにすることである。次いで、生物学的試料を予め取りつけたスライドでウェルを覆う。複数ウェルトレイの種々のウェルを、各ウェル内で種々の試薬を乾燥させて前処理し得る。多段階のアッセイは、複数ウェルトレイの各ウェル内で所望の試薬を予乾燥してある一つの複数ウェルトレイからその隣へスライドを装着したスライドホルダーを移動させることにより行い得る。この変形は、第1セットの試薬が迅速に溶解して生物学的試料に作用し、次いで、第二層が溶解して第二段階のための試薬を放出するようなやり方で、より少数のトレイ、うまくゆけば単一トレイの使用のみですむように、各ウェル内で試薬の多層コーティングを使用することである。

【0006】

本発明の別の態様は、各スライドに対照をビルトインすることである。これはそこに陽性対照および陰性対照を取り付けたスライドの一部である。これらの対照により、各スライドが各自で対照のセットを有するので、各個別のスライドについてアッセイが適切に作動しているか否かを判断し、各スライドについてどれが標識として同時に作用しているかを決定することを可能にする。

【0007】

本発明はまた、試薬を保有するための凹面ウェルを有するカバースリップに関する。このカバースリップは、分析を行うための試薬を保持するが、スライドを洗浄するために容易に取り外せるように、スライド上に取り付けられ得る。カバースリップはアッセイのためにそこで予乾燥した対照を含み得る。

【0008】

本発明の別の態様は、カバースリップを連結した反応室において生物学的試料を自動処理することであり、該カバースリップにはその上で試薬を予乾燥し、かつその上に対照の試料を場合により予めスポットしておくこともできる。

【0009】

図1は、複数のスライド70を有するスライドホルダー1を例示する。スライドホルダー1は穴11を設けたハンドル5を含む。スライドホルダーの各開口部7により、各スライド70の標識が見える。標識はまたスライドホルダー1の領域15に直接添付してもよい。各スライド70はスライドホルダー1の各スロット56に挿入してある。

【0010】

図2A-Bは、トレイ14およびスライド70を例示する。図2Aは、トレイ14の正面立面図である。ウエル24は溝38によって分けられている。ウエル24の境界44は平らで、ウエル24の内部より隆起している。溝90は溝38に隣接している。図2Bは、図2Aのライン54-54により切断したトレイ14の断面図である。この図はウエル24、溝38およびウエルの境界44を示す。スライド70は一つのウエル24上に置かれているところを示す。

【0011】

図3は、生物学的試料220とスタンプ230を有するスライド70を例示する。図示したスタンプは、試薬A-Fを含有する。

【0012】

図4は、ウエル24を例示し、該ウエル内には3種の試薬(250、260および270で示される)が乾燥させてあり、該ウエル上には生物学的試料220を取り付けたスライド70を置いてある。試薬の層を互いに分ける非活性物質の層は図示していない。

【0013】

図5A-Bは、熱サイクラー、ポンプおよび中央処理ユニットと共に、生物学的試料をアッセイする数段階の自動化処理に用いる多数ウエルのトレイ330の一つのウエルを例示する。図5Aは、取り付けた生物学的試料220がウエルま

たは反応室280に置かれているスライド70を示す。反応室280と連結している入口300および302、および出口294および296を図示している。反応室280の底部を形成するトレイ330の一部を282として図示している。反応室の底部282が試料220を押し付けるのを防ぐ任意の菌止め281を図示している。図5Aの図は、“開”状態にある反応室の底部282を示し、この状態によって反応室280は大容量を有する。図5Bは、他の任意の装備に連結している図5Aのトレイおよびスライドを示す。図5Bにおいて、反応室の底部282は“閉”状態にあるので、反応室280は図5Aで示されたのよりも少ない容量を包含する。反応室の底部282を動かすピストン284を図示する。ピストン284は中央処理ユニット286により制御する。スライド70に押し付けられている熱サイクラー288を図示する。熱サイクラーはまた中央処理ユニット286により制御し得る。管材料は入口300および302、および出口294および296に取り付け得る。管材料に取り付けられたポンプ290を図示し、ポンプはタンク291または292へ、またはタンク291または292から、またはゲル298へ液体を押し出す。

【0014】

図6A-Eは、単一のスライド上で細胞の多数の染色体の全染色体彩色を行うために使用するか、または生物学的試料にin situハイブリダイゼーションまたはFISHを行うために使用し得るトレイを例示する。図6Aは各ウエル410を有する8ウエルトレイ400を例示する。各ウエルは隣接のウエルと溝420で分けられている。各ウエル410は開口部またはチャネル430を有し、そこから液体をピペットで採取し得る。図6Bは図6Aに示した8ウエルトレイ400の側面図である。スライド70はトレイ400上に示してある。4つのウエル410を図示しているが、そのうちの3つのウエルは空であり、1つは液体で満たされている。開口部430および溝420も図示してある。図6Cは図6Aおよび6Bのスライドおよびトレイの正面図である。溝420を2つのウエル410の間に示す。ウエル410への開口部430を図示してある。スライド70はトレイ400の上方に置かれているところを示してあり、スライド70をトレイ400に保持するための任意のクリップ402を示してある。図6Dは、8ウエ

ル410の各々に接触しているスライドの8領域440を示しているスライド70の概略図である。これは例示にすぎず、実際使用されるスライドにこれらの領域440を実際に表示する必要はない。図6Eは、1つの領域440の拡大図を示して、スライド70上にビルトインした対照を設計する一つの方法を示す。各領域440は核酸442を有し、該核酸はアッセイで使用されるプローブをハイブリダイズし、領域440の周辺部に配置される。これらの対照はハイブリダイゼーションの間プローブと接触している。

【0015】

図7A-Hは、凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【0016】

図8A-Dは、カバースリップと連結している顕微鏡スライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【0017】

(技術分野)

本発明は、複数の生物学的試料（生物学的サンプル）を顕微鏡スライド上において、通常方式より一層迅速かつ効果的なしかもより低コストな方式で、処理するための集積システムである。本発明の開示の背景技術は、その多くが米国特許第5958341号(W.-S. Chu; September 28, 1999 付)に記載されており、それらは参照して本明細書の一部とする。本書の開示中で使用する各部品の付与番号は、もし本書中に記載がなければ、米国特許第5958341号(W.-S. Chu) に示されている番号を参照するものである。

【0018】

(発明の開示)

生物学的試料とは、組織切片、生検標本(biopsy)、細胞塗布標本(cell smear)、核酸、タンパク質またはペプチド、染色体、体液またはその他の一般的に顕微鏡下で観察される生物学的材料、などを意味する。図1および2A-Bに例示説明したシステムは、スライドホルダーとトレイまたはカバースリップ（図7A-Hおよび8A-D参照）とからなり、同時に多数の、好ましくは6つまでの、顕

顕微鏡スライドを保持し、多数のスライドの同時処理を可能とするものである。このスライドホルダーは再使用してもよい。

【0019】

実際では、生物学的試料を分析しようとする各スライド上にマウントする。これはしばしば生物学的試料をホルマリン中で固定させ、該試料をパラフィン中に埋め込み、薄く連続した切片を該パラフィンまたは凍結した組織から切り出し、該切片を顕微鏡スライド上にマウントする各段階を含む。これらは室温で一夜乾燥させる。マウントした生物学的試料は、ある種のアッセイ例えば、染色工程に付される。このためマウントした各試料は、洗浄段階では試薬を変えて処理する間一連の異種溶液といつも接触しているように置かれねばならない。本発明では、各試薬をトレイ14中の各ウエル24中に秤り込みまたは予乾燥する。充分な試薬と緩衝剤をウエル24に加えて完全に満たし、該ウエル中の溶液が、該ウエル24の上部に置かれることとなる顕微鏡スライド70と接触するようにする。ウエル24中の溶液と顕微鏡スライド70との間には気泡が存在してはならない。正確にウエル24を満たすか、またはやや多めにウエル24を満たすようにすると、スライド70をウエル24の上部に置いたときに軽度のオーバーフローが生じるようになる（表面張力がウエル24中の溶液をスライド70がその上部に置かれるまで保持している）ので、気泡生成の問題は全くない。ウエル24中のスライド70と接触している液体の毛管作用が、生物学的試料と試薬との横ざまでの良好な接触をウエル24の全領域で可能とし、かつウエル24の封止を助ける。トレイ14は、ウエルの境界44の一端にあるフックを含むように設計し得る。これは、米国特許第5958341号(W.-S. Chu)の図4Cおよび4Fに示されている。全スライド70をこのフックに押しつけることにより、全スライドをウエルの境界44に対して保持させ、各ウエル24内で試薬との良好な接触を確実にすることができる。

【0020】

上記の要領で各スライド70をトレイ14上に置くことにより、マウントした生物学的試料はウエル24中で下向きになり、かつ空気に触れないようになる。このことは、インキュベーションの間中、無関係の物質が試薬中にまたは生物学

的試料上に落ち込むのを防ぐ。さらに、スライド70はウエル24を覆い、インキュベーションの間中、ウエル24内の試薬溶液が蒸発することも防ぐ。蒸発は極めて悪い背景シグナルをもたらす得る。本発明はこの問題の克服にも役立つ。

各試薬とインキュベーションの後、スライドホルダー1とトレイ14とを摘み上げ、500mlのリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)を入れた標準的染色皿中に入れる。PBS中に入れると、スライド70とトレイ14との間の表面張力は消滅し、各スライドは極めて容易にトレイから除去できるようになる。次いで各スライドは適当な洗浄段階を経由させる。6つのスライド70を一回で摘み上げることは、それらが全部単一のホルダー1に着いているので簡単なことである。実験室内の標準的染色皿は、6つのスライド70を横ざまにして(単一のホルダー1に着いている場合)収容するのに十分な大きさがあり、また20のスライドホルダー1を含有し得る。それ故、120のスライド70を同時に洗浄し、処理できる。

【0021】

上記方法は、汚染を防ぐのに役立つ包み込まれたアッセイシステムとなるので改良である。また、この包み込まれたシステムは、蒸発を防いで試薬の存在量を一定にし、その結果、試薬の量が分かっており一定濃度にあるようにする。これらの特徴は、単に試薬類をスライド上にマウントした組織試料の上に滴加する、従ってそれが周囲の雰囲気開放されており汚染および蒸発が起こり得る従来技術より、一層良好かつより首尾一貫した結果をもたらす。

【0022】

本発明の他の態様は、トレイ14の複数のウエル24内で試薬類を前乾燥することであり、その結果、アッセイに際して、該トレイ14と各スライド70とを水または緩衝液に単に浸漬するか、または水または緩衝液をピペットで各ウエル24に掛けるだけでよいようにすることである。このトレイ14は、例えば多数のウエルを有するトレイ14の各ウエル24内に前乾燥した異種試薬類のセットを有し得る複数のウエルのトレイ14のような、多数のウエルを有するトレイ14の各ウエル24内に前乾燥した一連の試薬類を含むものとして製作できる。アッセイに際し、各スライド70は、それらの上に単一の患者由来のまたは異なる患

者群由来の生物学的試料をマウントし、そして単一のトレイ14上に置いて一度に多数のアッセイを実施することができる。前乾燥した試薬類を有するそのようなトレイ14は、事前に製作しておき使用時点まで貯蔵することができる。近時実用されている生物学的試料についての実施アッセイは、試料をスライド上にマウントし、次いで試薬を該試料上に滴加して実施する。そのような方法は、試薬類が予め測定されており、前乾燥してあるため、水または緩衝液を添加するだけで済むというような利点は有し得ない。本明細書中に開示する本発明では、試薬類はトレイ14上のウエル24内で前乾燥しておくことができ、水または緩衝液をウエル24に添加し、生物学的試料をそれにマウントしてあるスライド70を該ウエル24上に置き、試料側を下向きにする。水または緩衝液は、スライド70をウエル24の上部に置いてからチューブを経由してウエル24に加えるようにしてもよい。スライド70をウエル24上に置くことは、包み込んだ反応室を形成し、汚染並びに蒸発を防ぐとともに、現時一般的に実施されているようなスライド上に溶液を滴加するのと比較して試薬類の均一な分布を確実にする。

【0023】

さらに本発明の別の態様は、各スライド上に、対照および／または標識をビルトインすることである。既知の対照は、生物学的試料から離れた領域に固定化されたものである。例えば、この対照は、生物学的試料中で検査されようとしている抗原、ペプチド、タンパク質または細胞であることができ、あるいはもしハイブリダイゼーションアッセイが実施されようとしているなら既知配列の核酸でもあり得る。これらは、アッセイが適切に機能するなら、シグナルを出すかまたは呈色するような陽性対照として作用する。陰性対照、例えば、タンパク質または抗原または核酸もスライド上に設けることができるが、ウエル中の試薬類と反応しないものでなければならない。例えば、6つの抗原性測定物A-Fの存在について検査されると仮定する。各ウエルが異なる抗体A'-F'を有する1枚の6ウェルトレイ使用することができる。この6種の異なる抗原性測定物を全6スライド上にスポットしておくことができる。すべての場合に、これらの対照の中で一つだけが、各スライド上で陽性を示すものであるべきである。例えば、スライドAは抗原性測定物Aだけが陽性のシグナルを示すべきであり、スライドBは抗

原性測定物Bだけが陽性のシグナルを示すべきである。これらは外部対照として働くものである。もし、1以上の対照が陽性を示すならば、これは抗体交叉反応が起こったことを示す。もし、どの対照も陽性を示さないならば、右反応が起こらなかったこと、即ち、その試薬がなくなっていることを示す。検査する生物学的試料は、内部対照として働く。

【0024】

外部対照は、各種の手段で各スライド上に置くことができる。好ましいやり方は、キシレンまたはアルコールに抵抗性の糊を使用する、スタンプやスティッカーと均等な物の上に試薬をスポットすることであり、それは、次いで各スライド上に糊付けする。それらのスタンプやスティッカーは、それにタンパク質、ペプチド、細胞または核酸が緊密に結着する任意の適した材料で製造できる。これには、それらに限定されないが、常用の例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラスまたはナイロン製膜類が含まれる。そのような膜様材料の具体的な例は、ニトロセルロースそれ自体、Immobilon-P (Millipore), Hybond-N, Hybond-N⁺ および Hybond C-extra ニトロセルロース (Amersham), Genescreen および Genescreen Plus (Du Pont), Clearblot-P (ATTO Co.) および ポリビニルジフルオリド膜類 (Millipore or BioRad) などである。これらのスタンプやスティッカーは、図3中に示す領域A-Fを有し得る。これらのスタンプやスティッカーは、予め製造しておき、該スタンプやスティッカー上に抗原性測定物である、タンパク質、ペプチド、細胞または核酸を乾燥させるのにすぐ使用できるよう貯蔵しておくことができる。これらのスタンプやスティッカー上には、抗原、タンパク質、細胞、などの名称を印刷しておくことができる。これは大量生産の場合には特に適している。乳癌検査用パネルまたはホジキンス病検査用パネルのような、アッセイの標準的セットを予製しておくことができるが、所望に応じて外部対照として任意の試薬組合わせを設計することも勿論できる。対照のスタンプはスライドに生物学的試料を置く前にスライドに取付けておいてもよいが、スライドに生物学的試料をマウントし、その対照に適合する反応を実施するよう処理する時点まで対照のスタンプの取付けを遅らせてもよい。

【0025】

このスタンプ類は、実施しようとする特定の検査用パネルを指示する着色コードまたは番号を付しておくことができる。同様にしてトレイ14も、実施しようとする検査用パネルを指示する着色コードまたは番号を付するかその他の標識を付しておくことができ、それはトレイ14のウェル24中で前乾燥する試薬に応ずるものとする。スタンプとトレイとは、色または番号あるいは他の標識がマッチするようにすべきである。

本発明のさらなる態様は、ウェル24中で乾燥させる試薬類を、それらが働く順序と逆の各層中で乾燥させ得ることである。緩衝液を加えたとき最後に加えた試薬がまず溶けて活性となり、続いてその前の最後に加えた試薬が順に活性となるような具合にである。このようにして、2またはそれ以上の試薬を単一のウェル24に加えることができ、その結果、スライド70を第1のトレイ14から第2のトレイ14へ移動させる要なく、連続的な試薬群の作用を可能とする。多段階反応の場合、これは必要なトレイ14の数を減少させ、また、関与する労力をも減少させる。

【0026】

本発明の他の態様は、単一スライド上の各セル上で、24ヒト染色体のすべての全染色体描出を実施可能とするように特に設計したトレイまたはチップである。

本発明のさらなる態様は、トレイのウェル内空間容積を調節して、PCRのような反応を実施できる小容積を存在可能とし、そして該空間容積を次いで増加させ、液体が該ウェルを通してポンプ可能なように調節可能とした、トレイとスライドとの組合せ構成物である。

当業者は、スライド上の検査しようとするタンパク質、ペプチド、DNA、RNAまたは細胞を含有する試料、あるいは、スタンプ上の対照タンパク質、ペプチド、DNA、RNAまたは細胞は、アッセイの間中解放しないよう固定化しておくべきことを理解するはずである。タンパク質、ペプチド、核酸、などを含み得る、トレイ内で前乾燥し得る試薬類は、しかしながら、もし多層化してあるものであれば、水または緩衝液を加えたとき、プログラムした順序で解放されなければならない。

【0027】

実施例

各実施例では、生物学的サンプルを顕微鏡スライド70上に最初にマウントし、次いでアッセイする。種々の器官(リンパ節、肝臓、腎臓、肺、乳房、皮膚、前立腺)由来の、外科的および解剖学的なヒトの生物学的サンプルを、10%中性緩衝性ホルマリン中で通常通り固定し、組織プロセッサ上で一晩処理し、パラフィン中に埋め込んだ。連続切片を4-5ミクロン厚に切り出し、Probe-On-Plus Slides(#15-188-52; Fisher Scientific)上にマウントし、室温で一晩乾燥させた。次いで、スライド70を、再利用可能なスライドホルダー1中に挿入する。この時点で、単一ホルダー1中のすべてのスライド70(6つまでのスライド)を同時に取り扱うことが出来る。スライド70は、キシレンを入れ、それぞれ5分間づつ4回取りかえた染色皿中にスライド70を置き、100%エタノールでそれぞれ1分間づつ2回処理し、そして95%エタノールでそれぞれ1分間づつ2回処理し、脱パラフィン化する。各脱パラフィン化組織切片スライド70を綺麗にし、脱イオン水で洗浄する。

【0028】

本発明は、更に下記実施例において詳細に説明するが、それは、例示説明のために提供するものであって、いかなる意味においても本発明を制限することを意図するものではない。当分野に既知の標準的な技術または特に以下に述べる技術を用いる。

【0029】

実施例1免疫細胞化学

この実施例では、生物学的サンプルは、抗体(一次および二次)で処理し、クロモゲンカラー顕色処理し、最終的に対比染色する。

【0030】

A. マウントした組織サンプルのタンパク質分解性前処理

当分野では、免疫細胞化学染色用の特定の抗体を用いるとき0.4%ペプシン、pH2.0のようなタンパク質分解性酵素によりホルマリン固定した組織切片

を前処理する必要があることが知られている。これが必要であるとき下記のステップが有用となり得る。数滴(150-200 μ L)のタンパク質分解性消化溶液を3または6ウェルトレイ14の各ウェル24に置く。スライド70の組織スライドを下に向けてウェル24に合せる。スライド70を伴うスライドホルダー1をゆっくりと下し、トレイ14のウェル24上に置く。気泡が、スライド70の組織側とトレイ14のウェル24中の溶液との間に残らないようにすべきである。スライド70、スライドホルダー1および溶液を有するトレイ14を15分間40℃でインキュベーションする。

【0031】

多くのサンプルを一度に処理しようとするならば、このタンパク質分解性前処理ステップの間はトレイ14の使用を差し控えるとより効率的である。まだ、スライド70は、一つのホルダー1あたり6つのスライドホルダー1中に置いておく。次いで、スライドホルダー1およびスライド70をタンパク質分解性消化溶液(再利用し得る)500mLの入った染色皿中に垂直に入れ、水浴中で20分間40℃でインキュベーションする。この前処理ステップで20までのスライドホルダー1(120スライド)を染色皿中に同時に入れることができる。

【0032】

ある種の抗体では、組織切片がマイクロ波抗原修復で前処理する必要がある。スライド70を有するスライド1(20まで)を0.01Mクエン酸緩衝液500mLの入った染色皿中に垂直に入れ、その染色皿をマイクロ波オーブンの中央に置き、そして当該オーブンで、ハイパワー(800-850ワット)で7-8分間、溶液を高速沸騰させる。当該オーブンのスイッチを切り、そのパワーレベルを400ワットにセットし、そのオーブンで再び7-8分間、溶液を加熱する。

【0033】

タンパク質分解性消化およびマイクロ波処理後、組織切片をリン酸塩緩衝性生理食塩水(PBS)各500mLで3回、染色皿中で洗浄する。

【0034】

B. ヤギおよびウマ血清による組織切片の処理

タンパク質分解性消化およびマイクロ波処理をするにしろ、しないにせよ、室

温で20-30分間、5%混合の通常のヤギおよびウマの血清と共にインキュベーションする。トレイ14の各ウェル24(約150-200 μ l)を混合したヤギおよびウマ血清で満たす。スライド70の組織側を下向けてウェル24上に置き血清と接触させる。スライドホルダー1を、スライド70とウェル24の間に気泡が入らないようにゆっくりと下す。さらに、多くのサンプルを同時に処理しようとするならば、20までのスライドホルダー1を5%混合の通常のヤギおよびウマ血清500mLの入った染色皿中に20-30分間、垂直に入れることにより一度にこのステップを行うことがより効率的である。

【0035】

C. 一次抗血清または抗体の適用

血清とのインキュベーション後、スライドホルダー1およびスライド70ならびにトレイ14をPBSの入った染色皿中に入れる。トレイ14をスライドホルダーから離し、両方をPBSで一度洗浄する。洗浄したトレイ14を次のステップに再利用する。前希釈した一次抗血清または抗体(約150-200 μ l)をトレイ14の各ウェル24に適用する。まだスライド1内にある洗浄したスライド70を組織側を下にウェル24上にのせる。いつものように、スライド70とウェル24中の試薬溶液との間に気泡が入るのを避けるよう注意しなければならない。当該サンプルは、室温で2-4時間抗血清または抗体と共にインキュベーションするか、40℃2時間、湿チャンバー内でインキュベーションするか、または室温で一夜、湿チャンバー内でインキュベーションし得る。インキュベーション後、スライドホルダー1および付着スライド70をトレイ14から取り出し、PBSで3回染色皿中で洗浄する。

【0036】

D. 二次抗体の適用

前希釈した二次抗体(約150-200 μ l)を新しいトレイ14の各ウェル24中に適用する。スライドホルダー1のスライド70を、気泡を注意深く避けながら組織側を下向けにしてウェル24上に置く。これを30分間40℃、湿チャンバー内でインキュベーションする。インキュベーション後スライドホルダー1および付着スライド70をトレイ14から取り出し、PBSで3回、染色皿中で洗浄す

る。

【0037】

E. 内因性ペルオキシダーゼ活性除去のための処置

付着スライド70を有するすべてのスライドホルダー1を3%過酸化水素および0.1%アジド化ナトリウムを有するPBS500mLの入った染色皿に入れ、室温で15分間インキュベーションする。過酸化水素PBSとのインキュベーション後、スライドホルダー1および付着スライド70をPBSで3回、染色皿中で洗浄する。

【0038】

F. ABC複合体“ELITE”の適用

ABC複合体(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)を、PBSを用い作業濃度にまで希釈する。作業濃度(約150-200 μ L)を新しいトレイ14の各ウェル24に適用する。スライド70を付着スライドホルダー1とともに、溶液とスライド70との間に気泡が入らないようにトレイ14上に組織側を下に注意深く置く。スライド70およびABC溶液を有するトレイ14を40℃30分間、湿チャンバー内でインキュベーションする。インキュベーション後、付着スライド70を有するスライドホルダー1をトレイ14から取り出し、PBSで3回、染色皿中で洗浄する。

【0039】

G. ジアミノベンジジン(DAB)を用いるクロモゲンカラー顕色

DAB溶液を、PBS100mLにDAB100mgを添加し、30% H_2O_2 50 μ Lを加えることにより調製する。約150-200 μ LのDAB溶液を、各ウェル24を完全に満たすように新しいトレイ14の各ウェル24に加える。スライド70を付着スライドホルダー1とともに気泡が入らないように注意深く各ウェル24上に組織側を下向に置く。顕微鏡で、DABを有するスライドホルダー1およびトレイ14を観察することにより色顕色をモニターし得る。着色沈殿が、陽性細胞の部分において生成する。色は、2-5分後現われ始め、通常、10分以内に充分な顕色に到達するが、20-30分のインキュベーションが、染色の弱いサンプルには必要であり得る。顕色を停止するために、スライド7

0を有するすべてのスライドホルダー1をトレイ14から取り出し、脱イオン水で3回、染色皿中で洗浄する。

【0040】

H. 対比染色

スライドホルダー1および付着スライド70を10-50秒間、Harris's ヘマトキシリン中に浸漬し、脱イオン水中に3回くぐらせて洗浄する。次いで、全てのスライド70を30秒間、0.2%水酸化アンモニウム中に浸し、脱イオン水中に3回くぐらせて洗浄する。スライド70を95%エタノール中に2回、それぞれ2分間、少し浸し、その後、100%エタノール中に2回、それぞれ2分間、少し浸し、そして、最終的にスライド70をキシレン中に2回、それぞれ2分間、少し浸すことにより綺麗にする。

【0041】

I. カバースリップの取付け

スライドホルダー1にまだ装着してあるスライド70について各スライドの組織片側にCytoseal 60を一滴たらすか該側をプレマウントする。カバーガラスを各スライド70上に置く。これは、1つずつ行い得るが、適当に間を空けて整列させた実際には6つ(または3つ)のカバーガラスを6つ(または3つ)のスライド70と対応するように、特に設計したカバーガラスを用いるのがより効率的である。この特別なカバーガラスを用い、6つまでの個々のカバーガラスを実際に整列させ、同時にスライド70上に置く。当該カバーガラスは、それらを保持しているプラスチックのストリップから、スライド70と結合したままのカバーガラスからストリップをポキッと折れるように予め刻目を付けてあるカバーガラスを単に曲げることにより、一緒に、容易に分離される。この時点で、各スライド70を、個々に取り扱うためにスライドホルダー1から取り出し得るが、あるいは輸送容易とするためにスライドホルダー1に装着させたままとしてもよい。

【0042】

米国特許5,958,341(W.-S. Chu)の図10-12は、本発明の使用と、スライドにマウントした組織サンプルの表面上に試薬を滴下する標準手動方法を単に用い、インキュベーションの間中、大気に試薬を開放したままとする、染色

方法と比較する研究の結果について示す。これらの図は、当該2つの方法で得られる結果が、従来の方法を用いて得られる結果と少なくとも同程度およびそれよりも良好となる本発明を用いて得られる結果とよく匹敵することを示している。しかし、本発明では、これらの結果を少ない労力およびより少量の試薬の使用で得ることを可能とする。

【0043】

2つの方法を比較すると、バックグラウンドの染色は、本発明を使用することにより、特にポリクローナル抗体(抗 κ 軽鎖抗体および抗 λ 軽鎖抗体)を用いるときに、有意に減少する。本発明は、バックグラウンドを減少することにより、染色結果を有意に改善する。バックグラウンドは、重力により沈殿し、組織に非特異的に結合する遊離FCフラグメントに部分的に起因する。本発明の方法は、スライドを逆さまにして当該組織を上記溶液上に位置させ、そのため遊離FCフラグメントが重力により組織上に沈殿出来ないようにする。

【0044】

実施例2

in situ ハイブリダイゼーション

この実施例では、生物学的サンプルをスライド70上にマウントし、ビオチンまたはジゴキシゲニン標識プローブでハイブリダイズし、抗ビオチンまたは抗ジゴキシゲニン抗体と反応させる。次いで、当該サンプルを染色する。

【0045】

A. 組織サンプルの調製および取付け

組織サンプルを、核酸崩壊を防止する余分的手段以外は、上記と同様にして調製する。組織サンプルを10%中性緩衝性ホルマリン中で固定し、組織プロセッサ上で一夜処理し、パラフィンに埋め込み、4-5ミクロンの連続切片に切り出し、Probe-On-Plus Slides(#15-188-52; Fisher Scientific)上にマウントし、室温で一夜乾燥させる。スライド70をスライドホルダー1に挿入し、染色皿中に入れることにより脱パラフィン化する。スライド70をキシレンでそれぞれ5分間づつ4回処置し、100%エタノールでそれぞれ1分間づつ2回処置し、そして、95%エタノールでそれぞれ1分間づつ2回処置する。次いで、当該脱

パラフィン化組織切片スライドを綺麗にし、RNase Block(BioGenex, San Ramon, CA)を有する脱イオン水で洗浄する。

【0046】

B. マウントした組織サンプルのプロテイナーゼK処理

約150-200 μ Lの新しい希釈プロテイナーゼK溶液をトレイ14の各ウェル24内に入れ、各ウェル24を完全に満たす。各顕微鏡スライド70(まだスライドホルダー1にある)を組織側を下向きに各ウェル24上に置く。スライド70をウェル24中の溶液とスライド70との間に気泡が入らないように注意深くウェル24上にのせる。これを15分間室温でインキュベーションする。

【0047】

消化後、スライド70を装着したスライドホルダー1をトレイ14から取り出し、染色皿中、RNase Blockを含有するPBS 500 mLで5分間洗浄する。当該組織切片スライド70を、染色皿中の以下の溶液中に連続的に浸漬することにより、脱水する：RNase Blockを加えた蒸留水500 mLに10秒間、RNase Blockを加えた50%エタノール500 mLに10秒間、95%エタノール500 mLに10秒間、そして100%エタノール500 mLに10秒間。当該スライド70を室温で5分間乾燥する。

【0048】

C. ビオチニル化またはジゴキシゲニン標識プローブによるハイブリダイゼーション

ここでは、浅いウェル24(深さ0.02-0.08)を有するトレイ14を材料保持に用い得る。ビオチニル化またはジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブを含むハイブリダイゼーション溶液をトレイ14の各ウェル24に入れる。十分量の溶液を、各ウェル24に添加してウェル24を完全に満たす。これは、約50-100 μ Lの溶液を必要とする。各スライド70を、気泡が入ないように注意深く各ウェル24の上部に置く(この時はまだ3または6つをスライドホルダー1に装着させたままである)。スライドホルダー1を有するトレイ14およびスライド70を95℃のオープンまたはヒートブロックに8-10分間置き、核酸を変性させる。このステップは、mRNA配列のヘアピン構造また

は再度の折畳みを取り除く。当該変性後、スライド70を湿チャンバー中45℃で一夜インキュベーションする。ハイブリダイゼーションステップ後、スライド70を、トレイ14からスライド70を装着したスライドホルダー1を取り出し、スライド70を、染色皿中、2×SSC(標準クエン酸生理食塩水)で、37℃、5分間洗浄し、その後、1×SSCで37℃、5分間洗浄することにより洗浄する。この後、0.2×SSC中で30分間60℃で洗浄する。最終的に、スライド70をPBSで2回、それぞれ2-5分間、洗浄する。

【0049】

D. シグナル検出

スライド70を装着したスライドホルダー1を、5%混合の通常のヤギおよびウマ血清500mLの入った染色皿中に垂直に室温で20分間入れる。前希釈したマウス抗ビオチンまたはマウス抗ジゴキシゲニン抗体(150-200 μ L)を新しいトレイ14の各ウェル24に適用する。当該スライド70を、気泡が入らないように注意してトレイ14のウェル24上に置く。当該スライド70および抗体を有するトレイ14は湿チャンバー内で40℃、2時間インキュベーションする。

【0050】

抗ビオチンまたは抗ジゴキシゲニン抗体によるインキュベーション後、スライド70を有するスライドホルダー1をトレイ14から取り出し、PBSで3回、染色皿中で洗浄する。

【0051】

E. 二次抗体の適用

前希釈二次抗体(約150-200 μ L)を新しいトレイ14の各ウェル24中に適用する。スライドホルダー1中の当該スライド70を、気泡が入らないよう注意深く組織側を下向にウェル24上に置く。これを、湿チャンバー中、40℃、30分間インキュベーションする。インキュベーション後、スライドホルダー1および装着スライド70をトレイ14から取り出し、PBSで3回、染色皿中で洗浄する。

【0052】

F. 内因性ペルオキシダーゼ活性の除去処理

スライド70を装着したすべてのスライドホルダー1を、3%過酸化水素および0.1%アジド化ナトリウムを有するPBS500mLの入った染色皿に入れ、室温で15分間インキュベーションする。過酸化水素PBSとのインキュベーション後、スライド1および装着スライド70をPBSで3回、染色皿中で洗浄する。

【0053】

G. ABC複合体“ELTE”の適用

ABC複合体を、PBSを用い作業濃度までに希釈する。作業濃度(約150-200 μ L)を新しいトレイ14の各ウェル24に適用する。装着スライドホルダー1に装着したスライド70を、溶液とスライド70との間に気泡が入らないようにトレイ14上に組織側を下向に注意深く置く。スライド70およびABC溶液を有するトレイ14を40℃30分間、湿チャンバー内でインキュベーションする。インキュベーション後、スライド70を装着したスライドホルダー1をトレイ14から取り出し、PBSで3回、染色皿中で洗浄する。

【0054】

H. ジアミノベンジジン(DAB)を用いるクロモゲンカラー顕色

DAB溶液を、PBS100mLにDAB100mgを添加し、30% H_2O_2 50 μ Lを加えることにより調製する。約150-200 μ LのDAB溶液を、各ウェル24を完全に満たすように新しいトレイ14の各ウェル24に加える。スライドホルダー1に装着したスライド70を、気泡が入らないように注意深く各ウェル24上に組織側を下向に置く。カラー顕色を、顕微鏡で、DABを有するスライドホルダー1およびトレイ14を観察することによりモニターし得る。着色した沈殿は、陽性細胞の部分において生成する。色は、2-5分後現われ始め、通常、10分以内に充分顕色するが、20-30分のインキュベーションが、染色の弱いサンプルには必要であり得る。顕色を停止するために、スライド70を有するすべてのスライドホルダー1をトレイ14から取り出し、脱イオン水で3回、染色皿中で洗浄する。

【0055】

I. 対比染色

スライドホルダー 1 および付着スライド 70 を 10 - 50 秒間、Harris's ヘマトキシリン中に浸漬し、脱イオン水中に 3 回くぐらせることにより洗浄する。全てのスライド 70 を 30 秒間、0.2% 水酸化アンモニウム中に浸し、脱イオン水中に 3 回くぐらせることにより洗浄する。次いで、スライド 70 を 95% エタノール中に 2 回、それぞれ 2 分間、くぐらせ、その後、100% エタノール中に 2 回、それぞれ 2 分間、くぐらせ、そして、最終的にスライド 70 をキシレン中に 2 回、それぞれ 2 分間、くぐらせることにより綺麗にする。

【0056】

J. カバースリップの取付け

スライドホルダー 1 にまだ装着してあるスライド 70 について、各スライドの組織片側に Cytoseal 60 を一滴たらすか該側をプレマウントする。カバーガラスを各スライド 70 上に置く。これは、1 つずつ行い得るが、適当に間を空けて一列に並べた実際には 6 つ (または 3 つ) のカバーガラスを 6 つ (または 3 つ) のスライド 70 と対応するように、特に設計したカバーガラスを用いるのがより効率的である。この特別なカバーガラスを用い、6 つまでの個々のカバーガラスを実際に整列させ、同時にスライド 70 上に置く。当該カバーガラスは、それらを保持しているプラスチックのストリップから、スライド 70 と結合したままのカバーガラスからストリップをポキッと折れるように予め刻目を付けてあるストリップを単に曲げることにより、一緒に、容易に分離される。この時点で、各スライド 70 を、個々に取り扱うためにスライドホルダー 1 から取り出し得るが、あるいは輸送容易とするためにスライドホルダー 1 に装着させたままとしてもよい。

【0057】

実施例 3

PCR による in situ ハイブリダイゼーション

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) をインビトロ法として核酸の特定の断片少量を増幅するために行った。これは、後に組織切片内にある核酸の増幅を起すように in situ での研究に適応させた。本発明の装置はこれらを in situ PCR で行うために適切である。in situ PCR ハイブリッド形成用プロトコルの一例は Nuovo (1994) に記載されている。

【0058】

A. in situ PCR

一連の組織断片を4～5ミクロンの厚さに薄切りにし、Probe-on-Plusスライド70に装着し、室温で一夜乾燥する。装着した組織切片を脱パラフィンし、ペプシンを用い、ホルマリン中での固定時間の長さに応じて40℃で15～90分間消化する。ピロ炭酸ジエチル (DEPC) で処理した水でスライド70を1分間洗浄してペプシンを不活性化し、続いて100%エタノールで1分間洗浄する。次にスライド70を風乾する。

【0059】

ポリメラーゼ連鎖反応溶液はいずれかの標準的な操作法に従って作製する。たとえば、K.B. Mullis et al., 米国特許第4,800,159号を参照。緩衝液、5'-プライマー、3'-プライマー、水、Taq ポリメラーゼ (AmpliTaq, Perkin Elmer) (またはその他の好熱性ポリメラーゼ) およびセルフシール試薬 (MJ Research, Inc.) を混合して全容20～50 μ Lとする。この溶液20～50 μ Lを特別に設計したin situ PCRアルミニウム製トレイ14のウェル24に入れる。実施例1で使用するためのトレイ14は好ましくは使い捨てのプラスチック材料で製造するが、PCR研究用のトレイ14は95℃～100℃に達することもある一連の温度を経過して循環して使用されることができなければならない。それ故、このトレイ14は熱抵抗性である必要があり（すなわち、高温によって溶融または破壊されてはならない）、また、熱の良導体である必要がある。アルミニウムはトレイ14を製造するために好適な材料である。これらアルミニウムトレイ14は深さ0.005～0.03mmで、溶液約20～50 μ Lを保持できるウェル24を有する。

【0060】

アルミニウムトレイ14の各ウェル24の全てに注入した後に、スライドホルダー1および装着したスライド70をトレイ14の上部に置いて、組織切片を持つ表面を下向きにして、置かれた位置の下にあるウェル24の中にある溶液と接触させる。溶液とスライドとの間に気泡が存在しないように注意しなければならない。スライドホルダー1、スライド70、およびアルミニウムトレイ14を次にサーマルサイクラーのブロック上に95℃で3～5分間置いて、組織内の核酸

を変性させる。次に60℃で2分間と94℃で1分間との間での20～30サイクルを行う。

【0061】

サイクル段階に続いて、2 x SSCを入れた染色皿にスライドホルダー1、スライド70、およびアルミニウムトレイ14を垂直に入れて35℃で5分間保持する。アルミニウムトレイ14からスライドホルダー1を外し、0.5～1 x SSCを用いて37～60℃で10～30分間（バックグラウンドに応じて）洗浄する。in situ ハイブリダイゼーションをプライマー内部に選択されたビオチン化プローブまたはジゴキシゲニン標識プローブを用いて実施例2に記載した通りに実行する。

【0062】

B. 逆転写酵素in situ PCR

一連の組織断片を4～5ミクロンの厚さに薄切りにし、Probe-on-Plusスライド70に装着し、室温で一夜乾燥する。RTin situ PCRではネガティブおよびポジティブ対照の双方を試験することが重要であり、また、これらと同じスライドガラス上で行うことが好適である。ポジティブ対照はDNアーゼ消化段階を省略するものであって、標的とする特異的な増幅、DNA修復およびミスプライミング、からの強い核シグナルを発生させるべきものである。ネガティブ対照にはDNアーゼ処理に加えて細胞内の標的に対応しないプライマーを使用する。被検検体ではDNアーゼ処理を進行させるが、所望の標的核酸に特異的なプライマーを使用する。装着した組織断片を脱パラフィンし、ペプシンを用い、ホルマリン中での固定時間の長さに応じて40℃で15～90分間消化する。ピロ炭酸ジエチル (DEPC) で処理した水でスライド70を1分間洗浄してペプシンを不活性化し、続いて100%エタノールで1分間洗浄する。次にスライド70を風乾する。

【0063】

予め希釈したRNアーゼ不含のDNアーゼ（約150～200 μ Lを要する）でプラスチックトレイ14の各ウェル24を満たし、スライド70（スライドホルダー1に装着した）の組織側を下向きにしてウェル24の上に位置させることによって装着した組織断片3個の中の2個をRNアーゼ不含のDNアーゼで消化する。この

際、気泡が捕捉されないように、また、ウェル24の中の溶液と組織検体との間
が接触するように注意する。一夜37℃でインキュベーションする。DEPC水で1
分間洗浄し、続いて100%エタノールで1分間洗浄してRNアーゼ不含のDNアー
ゼを不活性化する。スライド70を風乾する。

【0064】

逆転写はEZ RT PCRシステム (Perkin-Elmer) を用いて行う。RT/増幅 (RT-PC
R) 溶液はEZ rTth緩衝液、各200 μ Mのd ATP、d CTP、d GTPおよびd TTP、4
00 μ g/mlのウシ血清アルブミン、40単位のRNasin、0.8 μ Mの5' - および
3' - プライマー、2.5mM-塩化マンガン、5単位のrTthおよび2x濃セルフシー
ル試薬 (MJ Research, Inc.) を含有する。RT-PCR混合物20 μ Lから50 μ Lを
特別に設計したin situ PCRアルミニウムトレイ14の3個のウェル24の中を
満たす (ウェル24の深さは約0.005~0.03mmである)。スライド70を注意深
くウェル24の上に置いて、組織をウェル24の中にある溶液と接触させる。ス
ライド70、スライドホルダー1およびアルミニウムトレイ14を65℃のサー
マルサイクラーのブロック上に30分間置き、続いて94℃で3分間変性段階に
置く。各サイクルを60℃で2分間と94℃で1分間との間に設定して20~3
0サイクルを行う。

【0065】

循環段階の後に、スライドホルダー1、スライド70およびアルミニウムトレ
イ14を2x SSCを入れた染色皿に垂直に入れて37℃に5分間保持する。スラ
イドホルダー1をアルミニウムトレイ14から外し、0.5~1x SSCにより37
~60℃で10~30分間 (バックグラウンドに応じて) 洗浄する。in situ ハ
イブリダイゼーションをプライマー内部に選択されたビオチン化プローブまたは
ジゴキシゲニン標識プローブを用いて実施例2に記載した通りに実行する。

【0066】

当業者が認識するようにPCR以外の増幅方式も今ではよく知られており、PCRの
代わりに広範に使用されている。これらには連結増幅 (またはリガーゼ連鎖反応
、LCR) およびQ- β -レプリカーゼの使用に基づく増幅法を包含する。また、鎖
置換増幅法 (SDA)、好熱SDA、および核酸配列に基づく増幅法 (3 SRまたはNASB

A) も有用である。たとえば、PCRについては米国特許第4,683,195 および 4,683,202号および Innis et al. (1990); LCR についてはWuとWallace (1989); SDA については米国特許第5,270,184 および 5,455,166号および Walker et al. (1992); 好熱SDAについては Spargo et al. (1996); および3SR および NASBAについては米国特許第5,409,818号、Fahy et al. (1991) およびCompton (1991)を参照。

【0067】

実施例 4

多層乾燥試薬入りのウェル

アッセイはウェル24の中で予め乾燥した単一の試薬を用いて行うことができる。また、数種の試薬が必要なら、生物学的検体を載せたスライド70を第一の試薬を入れた第一ウェル24から第二の試薬を入れた第二ウェル24に移動させることができるなどであるが、この様々なウェル24は同一または別々のトレー14上のいずれにあってもよい。あるいは、1種を超える試薬をウェル24の中で予め乾燥しておいてもよい。これらの試薬は最も外側の層を使用すべき最初の試薬の層とする、数層として乾燥することもできる。これを図4に示すが、そこでのスライド70は細胞または組織の切片220を載せてある。これはウェル24の上に置いてあるが、このウェルには第二の抗体270、第一の抗体260およびプロテイン遮断剤250の順序で予め乾燥してある。このようにして様々な試薬を分離し、乾燥し、保存して、ウェルに水または緩衝液を加えるまで反応を防止する。ウェルに水（塩がウェル中で予め乾燥してあれば）または緩衝液を加えると、ウェル24中の最終層の中に乾燥してあるプロテイン遮断剤250が最初に溶解する。次に第一の抗体260が溶解し、最後に第二の抗体270が溶解して反応が可能になる。このような系では、スライド70をトレー14から別のトレー14に、またはウェル24から別のウェル24に、移動させる必要なしに、3段階の全てを行うことが可能になる。例えば一連の試薬4種が必要なものなど、別型のアッセイには、単一のウェル24中で反応とは逆の順序で試薬4種を予め乾燥しておくか、または各々が試薬2種を持つトレー2枚を使用するか、一方のトレーには試薬3種を入れ、第二のトレーには第一のまたは第四の試薬を入れて

おいてもよい。例えば、第一トレーの操作と第二トレーの操作の間に洗浄が必要な場合など、有効に作用するようにすることがよい。これらの方式に関するその他の変形は当業者には自明なものである。このような組合せでは、いずれも別々にトレー4枚を使用するよりも必要とする取扱いの数が少なくて楽である。実施すべきアッセイの型が十分に標準化されている、特に病理学の分野では、このような系は予め乾燥した試薬を有し、次に使用するまで貯蔵できるトレーを大量生産するのによく適している。この系は抗原／抗体反応の使用に限定するものではなく、他種の反応にも使用できるものであって、たとえば、酵素をウェル中で乾燥でき；核酸のハイブリッド形成をウェル中で乾燥した様々なプローブを用いて実施でき；蛍光プローブが乾燥試薬であることができ；ビオチンがウェル中で乾燥でき；その他がある。

【0068】

様々な試薬の多重層を有するウェルを製造するためには、試薬層の間に不活性材料層を挟むことが好適である。例えば、各ウェルは次のようにして試薬で被覆してもよい。第二の抗体をウェル上に被覆し、乾燥させる。この表面を、高濃度の不活性材料（すなわち、反応のいずれにも必要ではなく、かつ、反応を妨害しない材料）たとえば、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、蔗糖、ウシ胎児血清、澱粉、アガロースまたはその他の不活性材料のようなもので被覆する。これを乾燥させる。たとえば、ゼラチン溶液を加え、乾燥させ、次にゼラチン溶液を追加し、乾燥する、など、不活性材料を数層として加えることは好適である。これは所望の回数行うことができるが、層の数は第二抗体の放出に至る時間の延長に影響を与える。第二抗体の表面上のこのような被覆5層は、この不活性層が溶解し始めた時間から第二抗体の放出までに約15～20分間の遅延を示す良好な結果が見出されている。不活性材料のこの第一層（または多層）の上に第一抗体を被覆して乾燥させる。第一抗体の上は不活性材料の第二層または多層で被覆する。これは低濃度のウシ血清アルブミン、ゼラチン、ウシ胎児血清、澱粉、アガロース、またはその他の不活性材料であることができる。第二不活性層のこのような被覆3層は、第二不活性層が溶解し始める時間から第一の放出まで約10分間の遅延を示す良好な結果が見出されている。第二不活性層の上を、たとえばウマおよ

びヤギの血清のようなプロテイン遮断剤で被覆する。プロテイン遮断剤を風乾する。不活性材料の多層は溶解に時間がかかるので、活性試薬の次の層が溶解する前に、各反応を進行させるために十分な時間が与えられる。

【0069】

この系の限界は一連の段階の間に洗浄段階が不要なときにのみ使用できる点にある。例えば、第一抗体の反応に第二抗体の反応を続けるならば、第二抗体は検出操作の前に洗い流さなければならない。それ故、検出試薬は第二抗体のウェルと同じウェル内で予め乾燥しておくことはできない。同様に、ある段階が加熱を要するなら（たとえば、核酸プローブの変性など）、熱で不活性化または分解される試薬と組み合わせることはできない。

【0070】

実施例5

ビルトインした対照および自動ラベル-イムノアッセイまたはISH/FISH

アッセイを臨床的条件で行なう場合、米国食品医薬品局により、対照を必要とされる。アッセイしようとするスライドそのものの上にビルトインした対照があるようにすることは、対照の試験に非常によい方法である。対照が完全に別のスライド上にある場合は、問題として、対照または実際の試験サンプル上の何れかで生物学的サンプルに接触しない試薬があったのかどうか、あるいは対照または試験サンプルの何れかに試薬を加える工程が欠けていたのか示され得ないので、その対照はよくない。また、とりわけ幾つかの試験を同時に行なう場合、対照サンプル上に滴下する試薬が、ヒトまたは装置の過誤による事故で、試験サンプル上に滴下される試薬と異なっているかもしれない。対照が試験サンプルと同じスライド上にある場合、このような問題は対照によって示されるであろうが、しかし対照が標準または悪性腫瘍組織の切片である場合は、対照サンプルの調製に非常に苦勞し、時間がかかる。

【0071】

図3は、組織スライス220をその上に固定したスライド70を例示説明しており、そしてスタンプまたは展着剤230（例えば、ニトロセルロースまたは他の膜の一片、あるいはスライド70上に接着したプラスチックまたはガラス型

の基質)その上に付け、6つの別個の領域A-Fを有するスライド70の別の領域を例示説明しているが、しかしスタンプまたは展着剤の使用は必須なものではなく、例えば対照をスライド70上に直接被覆することもできる。A-Fの各領域に、例えば明確な抗原性物質または核酸を、実施するアッセイの形式に応じてスポットしてもよいが、スタンプまたは展着剤230を使用する代わりに、これらの物質をスライド70の領域に直接適用することもできる。6つの分離アッセイを、6ウェルのトレイを使用して行なうことができる。各ウェル24は、それぞれA-Fと反応する試薬A'-F'を有している。対照Aは、試薬A'をウェル24上に配置したスライド70上でのみ陽性であり、そして残りの5つのウェルに対しては陰性であろう。対照Bは、スライド70上では、試薬B'をウェル24上に配置した場合のみ陽性であり、他の5つのウェルに対しては陰性であろう。等。これらの外部対照を有するスタンプまたは展着剤230を市販大量販売用に、または購入者側で調製できるように、前もって調製することができる。一般の臨床的アッセイパネル用のスタンプまたは展着剤230がカラーコードしたものであるか、または他の方式でラベリングされているのであれば、一目でアッセイが行なわれたか表示されるので有用である。このカラーコードまたは他のラベリングを、トレイ14のカラーコードまたは他のラベリングと一致させて、スタンプと併せて使用することができる。例えば、緑色スタンプは、その上に抗原性決定子A-Fを有し、そして緑色トレイは、抗体A'-F'を有する。カラーコード化スキームの代わりにナンバリングまたはレタリングシステムを使用することもできる。これらを乳癌の一連の試験に使用して、赤色スタンプおよび赤色トレイはホジキン病のアッセイに用いられるよう示すことも可能であろう。何れの型のカラーコード化(一連の色のストライプなど)を使用することもできる。このようなカラーコード化は、臨床的実験での誤用を少なくするであろう。陽性外部対照はそのスライドで行なわれるアッセイを表示するので、各スライド上の陽性対照を使用するとスライドに対して自動ラベリングシステムとして作用する。所望により、スタンプを対応するトレイとともに包装し、さらにスタンプを包装するときに各トレイ上に置いて、その後使用するときにはトレイから引き剥がし、そしてスライド上に置くことができる。このような、対照を有するスタンプまたは展着剤

を使用することは非常に簡便であり、対照生物学的サンプル(例えば、対照として使用する、正常または悪性腫瘍組織の組織切片)を調製するよりも時間がかからない。

【0072】

一例として、胸部のアッセイパネルを、6つの別個の診断用マーカーを使用して実施することができる。これらの診断用マーカーは、サイトケラチン 7、サイトケラチン 20、ER、Bcl-2、PR、およびカテプシン Dであり得る。これらの抗原性決定因子をそれぞれスタンプまたは展着剤上に被覆して対照として使用したり、対応する抗体を6ウェルトレイの分離ウェル上で前乾燥することができる。もしサイトケラチン 7 または均等な抗原性決定因子をスタンプまたは展着剤のポジションA上に置くなれば、サイトケラチン 7に対する抗体をウェルA'中に置くこととなる。スタンプまたは展着剤の切片Aは、ウェルA'上に配置されたスライドで陽性であるが、しかし他の 5 ウェルでは陰性であろう。また、スタンプの切片Aのみ、ウェルA'に配置されたスライド70で陽性であるが、スタンプまたは展着剤の切片 B-Fは陰性であろう。これは、ビルトインした対照によるスライドの自動ラベリングをもたらす。切片Aが陽性でなく、また切片B-Fがこのスライド上で陽性である場合は、問題が生じており、この試験を信頼してはならないことを意味している。

【0073】

使用し得るパネルの他の実施例は、Ki-67、Her-2/neu (c-erbB-2)、P53、pS₂、EGFκ、および因子 VIIIなどの、乳癌用の予想マーカーのパネルである。他の腫瘍(例えば、前立腺、膀胱、および大腸)も、同一の予後パネルトレイを使用することができる。一般的な病理学的業務では、4種のパネルトレイで、全造血性疾患の診断の90-95%をカバーすることができる；1)ホジキン病のパネルに、マーカー LCA (CD45)、L26 (CD20)、CD3、Leu-M1 (CD15)、Ki-1 (CD30)、およびLMPが含まれてもよい。2)ホジキンでないパネルに、L26 (CD20)、CD3、MT1、Bcl-1、Bcl-2、Ki-1(CD30)が含まれ得る。3)別のホジキンでないパネルに、カッパー、ラムダ、UCHL-1 (CD45RO)、CD5、CD23、およびCD10が含まれ得る。4)白血病パネルに、L26 (CD20)、CD34、MPO、Lyso、TdT、およびDBA44が含まれ得る。他の

所望試験パネルで同様に実施することができる；例えば限定するものではないが、知られていない第1次部位の未分化型腫瘍用のパネル、肉腫分類、リンパ腫対癌対黒色腫、腺癌対中皮腫、肝細胞性/胆管癌対転移性癌、下垂体パネル、パジェット病対黒色腫対扁平上皮癌対線維性組織球腫、乳房パネル、および膀胱対前立腺癌。さらに他の可能なパネルは、神経内分泌パネル、小円形細胞腫瘍、生殖細胞腫瘍、ホジキン対ホジキンでないリンパ腫、リンパ腫対反応性肥大、形質細胞血液疾患、白血病パネルおよびウイルスパネルである。

【0074】

各研究所は、人員、および実施するアッセイ数およびタイプに対して最も適切である、独自のシステムを工夫することができる。例えば、あるアッセイで、抗体の第1セットの使用、次いで第2次抗体が全てのサンプルに対して同一である第2次抗体との反応を必要とする場合、それから少数のアッセイを行わなければならない場合は、トレイ14上でこれらの反応を行なうことができるが、多数のアッセイを行わなければならない以外は、全スライドを、第2次抗体および/または検出システムとともに大型タンク中に配置して行なうようにしてもよい("バッチ"または"バルク"インキュベーション方法)。あるいは、少量のアッセイを実施する研究室用、フィルターペーパー片で第2次抗体および/または検出システムを被覆し、全スライドをフィルターペーパー上に置き、そして使用時にフィルターペーパーを湿らすこともできる。これはトレイを使用するよりも安価であり得る。同様に、核酸プローブをフィルターペーパー上に置いてもよい。

【0075】

実施例6

ビルトインした対照-核酸ハイブリダイゼーション

実施例5のイムノアッセイについての記載と同様の方法で、ビルトインした対照を、核酸アッセイ(ISHまたは蛍光in situ ハイブリダイゼーション(FISH)など)に使用することができる。FISHの一例として、蛍光プローブを使用して染色体の大部分を照射する。これは全体染色体彩色(WCP)といわれる。この技術は、転移などの総染色体異常の観測出に有用である。使用プローブを、種々の異なる色

のフルオロフォアと併せて使用することもできる。例えば、染色体 1 に対するプローブは橙色の蛍光を発することができ、染色体 2 に対するプローブは緑色の蛍光を発するようにすることができ、そして染色体 3 に対するプローブは赤色の蛍光を発するフルオロフォアを使用することができ、3つの染色体全てを同時に染色することが可能となり、相互を容易に区別することができる。ヒト細胞では、24までの別個の核染色体、染色体 1-22、XおよびY、がある。3つの異なるフルオロフォアを使用する場合、全24染色体を、たった8つの異なる組織切片または8つの異なる細胞セットを使用して研究することができる。

これらは、8つの分離スライドで研究をすることができ、または所望により、幾つかの組織切片または細胞セットを、単一スライドの別の区域上に配置することができる。単一スライド上に8つの組織区域を配置することができ、その結果、単一スライド上で全24染色体を、3種混合プローブの異なる8セットを使用して全ての反応を同時に実行して研究することができる。スライドを8つの分離ウェル(各ウェルはその中に前乾燥した3つのプローブの異なるセットを有する)を有するトレイまたはチップ上に配置して、これらを単一の細胞塗抹標本スライド上で試験することができる。マイクロアレイ技術を使用して24のビルトインした対照をスライド上で直接被覆し、内部の輪郭内で、各ウェル領域を包囲するようにしてもよい(図6E参照)。当業者が認識するように、3つのプローブの8セットを使用することは必須ではない。4種の異なる標識を付したプローブの6セットなど、他の変形も可能である。前乾燥した試薬を有するトレイを使用することも必須ではなく、むしろ試薬は液体形態でトレイに加えることもできる。同様に、ウェルの内部輪郭をとりまく領域中でスライド上に直接被覆した所望の数の対照を使用して、他の技術(in situ ハイブリダイゼーションなど)を実施することもできる。対照をウェルの端を包囲するようにスライド上に配置して示しているが、これらのパターンは必須ではなく、それらがウェル中で対照が試薬と接触する領域内にある限り、対照をアレンジする他のパターンを使用することもできる。

【0076】

実施例 7

自動化マルチウェルトレイおよび装置

たとえ自動化システムを用いても、その自動化システムがなお手動で操作すべき幾つかのステップを必要とするので、生物試料の分析は非常に労働集約型である。配管および一つもしくは複数のポンプに取り付けるかまたは自動化プロセッシング装置に接続したマルチウエルトレイもしくは予め乾燥した試薬を持つマルチウエルトレイを用いて、生物試料のプロセッシングを部分的にもしくは完全に自動化することができる。そのようなマルチウエルトレイは、先に議論したトレイ14とデザイン的に同様であり得る。しかし、自動化マルチウエルトレイ330(図5A~B参照)は、洗浄もしくは大量に用い得る高価でない試薬を用いるようなステップに使用される。自動化マルチウエルトレイ330の反応チャンバー280は、0.01~1mLのような容量を保持するようにデザインされているが、この量は重大ではなくこれより多くても少なくてもよい。ウェルは一つもしくはそれ以上の注入口および一つもしくはそれ以上の排出口を含んで配管を収容する。注入口に入る配管はポンプに取り付けられている。取り付けたスライド70を持つスライドホルダー1は自動化マルチウエルトレイ330の上部に置かれ、そして液体を300もしくは302のような注入口を通して反応チャンバー280中に注入することができる。試薬は反応時間の間は再循環し、所望により、ポンプ290ならびに排出口に通じる配管310と共同で注入口302に通じる配管295を使用することにより(例えば、図5Bに示すように)再使用し得る。この代わりに、使用した材料を直接に廃液容器291もしくは流しに送るか、または排出口296を経由して、ゲル上でもしくは他の機器により分析されることができる。循環する試薬は、培養もしくは反応時間を減少させそしてバックグラウンドを減少させ得る。循環する試薬の濃度はまた、特にマルチプルプローブを使用するとき、段階的に増加もしくは減少させたりして最適反応条件に達することができる。これは特に、種々の濃度の使用を可能にする柔らかい底のトレイを用いるときには、適用可能である。

【0077】

中央プロセッシングユニット286は試薬の注入を制御し、そして、一つのポンプが幾つかの異なった試薬を制御するか、もしくは、その代わりに複数のポンプを全て中央プロセッシングユニットで制御して使用し得るように、ポンプに取

り付けた配管の色々な部品上のバルブを開閉することができる。このセットアップで、スライドおよびのせられた生物試料を持つスライドホルダーをマルチウエルトレイ上に置くことができ、中央プロセッシングユニットを作動させ得て所望の液体および試薬を反応チャンバーに注入して、液体を再循環させるかまたは液体を直接に廃棄する。人がスライドを一つのトレイからもう一つのトレイに移す必要なしに、異なった試薬を反応チャンバーに順次注入することができる。例えば、生物試料を持つスライドを自動化マルチウエルトレイ上に置くことができ、そしてシステムが以下の試薬を注入することができる： キシレン、100%エタノール、90%エタノール、過酸化水素、2次抗体、検出試薬(ABC)、ジアミノベンジジン、ヘマトキシリン、各ステップ間のPBS洗浄溶液、および、更に90%エタノール、100%エタノールおよびキシレン、ならびにカバーガラス用溶液。先に説明したように、その間は反応を普通のマルチウエルトレイ14上で行わせるのが望ましいところの適切な中間ステップのどれについても、スライドを自動化マルチウエルトレイから取り外すことができる。

【0078】

もう一つの例として、のせられた組織切片を持つスライドを脱パラフィンして別個に処理し、そしてそれから、予め乾燥した試薬を有するマルチウエルトレイ上に置き、そしてそれから、自動化プロセッシング装置に取り付けることができるが、その装置は、例えば、2次抗体、検出試薬(ABC)、ジアミノベンジジンおよびヘマトキシリン、ならびに、各々のステップ間のPBS洗浄緩衝液、ひき続いて90%エタノール、100%エタノール、キシレンおよびカバーガラス溶液のような望ましい試薬を注入するであろう。

【0079】

自動化マルチウエルトレイの使用は幾つかの利点を有する。それは数個のステップを、各ステップにおいて手動労力を必要としないで、連続して行うことを可能にする。それはまたより安全であるが、その理由は、例えば発がん物質であるキシレンやジアミノベンジジンのような幾らかの危険な化学薬品を容器から直接に反応チャンバーに注入したり、そこから廃液容器中にもしくは別の容器に注入し得るが、その別の容器からは、人がこれらの試薬をウェルにピペッティングし

たりこれらの発がん物質をのせたトレイを取り扱う必要なしに、試薬を再使用することができるからである。スライドにのせられた生物試料の上部に単に試薬を滴下する従来の技術方法を用いるそんな試薬のリサイクリングは実用的でない。それ故に、自動化マルチウエルトレイは有害な化学薬品への露出を減少し、有害な化学薬品を廃棄することを容易にし、そしてまた、再使用してリサイクルし得るので、そのような化学薬品の使用を減少させる。

【0080】

中央プロセッシングユニット286はまた加熱ブロック288の加熱および冷却を制御して、*in situ* PCRを自動で実施もしくは*in situ* ハイブリダイゼーションに用いられるプローブを変性させることができる。所望によりビオチンもしくはジゴキシゲニンを含むPCR試薬およびプライマーセットは、トレイ330のウェルの上で被膜させたり乾燥させたりし得る。試料220を持つスライド70をトレイ330の上に置いて、そして水もしくは緩衝液を加える。加熱ブロック288は、スライド70(図5Bに示すように)もしくはトレイ330を背にして置いてよく、またはスライドプラストレイの両面に接触させるようにデザインしたものでもよく、そして中央プロセッシングユニット286によって制御させることができる。各々のウェル410から2つの結果を得ることができる。第一に、ウェル410からの液体を取り出してゲル298上でアッセイしてDNAのバンドが見られるかどうか決定することができる。そのようなバンドのサイズもまたゲル298上で測定することができる。これは、PCRがうまく作動しているかどうかを見るためのコントロールとしての役割を果たす。このことが可能であるのは、増幅されたDNAの大部分は試料の細胞中に残らないでウェル中の液体に漏れ出すからである。第二に、わずかなDNAは試料の細胞中に残り、そしてこれは当業者によく知られた方法によりビオチンもしくはジゴキシゲニンを検出することによって観察し得る。かくして、*in situ* PCRは、どの細胞がアッセイにより検出されるかを示す。

【0081】

本発明はまた新規な修飾法を用い、それは、組織試料の後処理を続ける前に、反応液体を回収しそしてこの液体をアッセイしてPCRが適切に作動しているか

もしくは汚染されているかどうかを決定することを可能にする。このアッセイは非常に迅速そして簡単であり、例えば、単に反応液体をアガロースゲル上で展開しそして特定のバンドサイズを探索する。PCRが適切に作動したことを決定した場合には、組織試料の後処理を続ける価値がある。然しながら、もしPCRが失敗したことを決定されたならば、その特定の試料でもって続ける労力と費用に値しないことを知ることになる。

【0082】

反応液体をアッセイする上述の能力は、その特定の試料の後処理を続ける価値があるかどうかを決定するのに有用であるだけでなく、その能力はまた、組織内における *in situ* ハイブリダイゼーションの結果のみを見ることから得られないデータを与える。*in situ* ハイブリダイゼーションを実施するときに、残りが溶液中で完了する間に、アンプリコンの多少の部分が増幅された所で残存する。溶液中のこの部分をアッセイすることにより、核酸の相対的な量を測定し得るだけでなく、増幅された核酸のサイズもまた測定することができる。単に組織試料を見るときには、生成されたサイズ生成物を測定し得ず、単に多少の核酸が増幅されたことを知り、そしてまた、どの細胞が核酸を発現していたかを知ることになる。これら二つのセットのデータは相補的である。本発明は両方が相補的であるデータと共に両方のセットの結果を見ることを可能にすることは明らかである。単一のポリメラーゼ連鎖反応から両方のタイプのデータを得ることを可能にするところの装置は現在まで入手可能ではない。

【0083】

この発明の更なる態様は、反応チャンバー280の容量が調節可能であることである。好ましくは中央プロセッシングユニット286は、フレキシブルもしくは可動性のどちらかである反応チャンバーの底282に対して押しているところのピストン284を制御する。この動きは反応チャンバー280中のスペースの容量を調節する。例えば、*in situ* PCRを実施するとき、反応容量を非常に少量に、例えば10～50 μ Lに保つことが望ましい。PCR反応後には、反応液体を反応チャンバーからくみ出すことが望まれるであろう。然しながら、そのような小容量の液体はスライド70と反応チャンバーの底282との間に

毛管作用により保持されるであろう。より多くの液体を含むように反応チャンバーを拡大させることにより、望ましいポンピングを達成することが容易になる。当業者は、種々の手段を用いて反応チャンバー280の容量を調節できることを認識している。中央プロセッシングユニットにより制御されるピストンを用いる必要はない。例えば、ねじ用具を反応チャンバーの底の背に置いてよく、そのねじ用具を回すことによりねじ用具はトレイの底を反対方向に押して反応チャンバーの底を顕微鏡のスライドの方に押すことで、反応チャンバー280の容量を減少させるであろう。このプロセスの逆転は容量を再び拡大する。

【0084】

実施例8

全染色体画法

染色体は、全染色体画法として知られる技法により転座のような著しい異常を検査することができる。この方法は、染色体に結合して効果的に全染色体を「ライトアップする」ところの数多くの蛍光的に標識したプローブを用いる。各染色体に対して特異的なプローブのセットを用いてどんな所望の染色体も研究できる。人間は全体で24の核染色体を有し、これらは染色体1-22、XおよびYである。一度に多数の染色体を描くことは一般的である。異なった色の蛍光プローブを用いることにより染色体は容易に識別される。例えば、染色体1、2および3は、一つの染色体に対してオレンジ色に蛍光発光するプローブを、第二の染色体に対して緑色に蛍光発光するプローブを、そして第三の染色体に対して赤色に蛍光発光するプローブを用いることにより同時に着色させることができる。そのようなシステムを用いると、一つの試験が典型的には8スライドの細胞を用いて人間の完全核ゲノムを検査するであろう。この試験は、トレイの8ウェルの上に8スライドを置くことを含むであろう。アッセイされるべき組織の一例は血液もしくは骨髄スミアである。プローブは、所望により、ウェル中で予め乾燥することができる。

【0085】

単一のスライド70上で全ての24染色体の分析を可能にするようにデザインされたチップもしくはトレイ400をここで提示する。このトレイ400は顕微

鏡スライド70にパチンと止めるか他の方法で取り付けることができるものである。このチップもしくはトレイ400は、各ウェル410が隣接するウェル410から隙間もしくは溝420により分離された8つのウェル410を含む。そのようなトレイ400は図6Aに図示されている。トレイ400中の各ウェル410は、それを通して試薬をウェル410に添加できる狭い開口部430を有している。

【0086】

実用的には、検査すべき細胞は顕微鏡スライド70の端から端まで滴下されるかもしれない。それからスライド70は、細胞がトレイ400のウェル410に面するようにトレイ400に取り付けられる。それから試薬は、トレイ中で各ウェル410への開口部430を通じて個別にウェル410へ加えられる。試薬は毛管作用によりウェル410およびスライド70の間に広がるであろう。種々の染色体に特異的な異なる試薬が各ウェル410に加えられる。ウェル410の間の隙間もしくは溝420は、試薬が一つのウェル410から隣接するウェル410に広がるのを防ぎ、それにより相互汚染を防止する。ウェル410は予め決められた量、例えば各々10~20 μ Lの液体を保持し、そして毛管作用が、過剰のオーバーフローを引き起こすことなくウェル410を満たすのに十分なだけの緩衝液が加えられることを可能にする。これは相互汚染の防止を手助けする。三つの異なる染色体を、例えば、オレンジ色、緑色および赤色の蛍光プローブを用いて、各ウェル410中でアッセイさせることができ、それにより単一のスライド70上で全て24の人間の染色体アッセイすることを可能にする。

【0087】

好ましい実施態様において、各ウェル410中に三つの異なる染色体に対するプローブを持つトレイ400の8つのウェル410上でプローブが予め乾燥される。所望であれば、塩類のような他の試薬もまた各ウェル410の中で予め乾燥し得る。分裂中期もしくは中間期の細胞はスライド70の端から端までに固定され、そしてスライド70はトレイ400と接触して置かれる。それから緩衝液を開口部430から各ウェル410に加える。この方法では、異なる試薬を各ウェル410の中にピペッティングする必要はなく、むしろ同じ緩衝液が全てのウェ

ル410に加えられ、そのために間違った試薬(人的エラー)をウェル410の中にピペッティングする可能性を防止する。予め乾燥したプローブと塩類は緩衝液をウェル410に添加すると溶解し、そしてハイブリダイゼーションを起こさせる。典型的な培養は、プローブを変性するために70~90℃で1~2分間であってもよく同様に細胞のDNAは引き続いて37~45℃で約2時間の培養でよいが、どこについての培養でも30分から終夜で実施するのが一般的である。ハイブリダイゼーション緩衝液は、技術上一般的に使用される幾つかの緩衝システムでもって望みどおりに選択され得る。例えば2XSSCが一般的に用いられる。フォルムアミドが時には緩衝液に加えられる。好ましい実施態様において、培養後にトレイ400をブロッティング材料、例えばペーパータオル、の上に置いてもよく、そしてウェル410中の反応液体は毛管作用により物理的にウェル410から除去されて、ブロッティング材料がハイブリダイゼーション液体を吸い取る。これは、スライド70をトレイ400から分離するとき、ウェル410の間における交差汚染を防止する。

【0088】

更に好ましい実施態様において、スライド70はポジティブおよびネガティブコントロールを区画440中に含み、それらは8つのウェル410の各々の中においてハイブリダイゼーション液体と接触するところのものである。最近全くポプラーになっているマイクロアレイ技術を用いて、染色体を描くために用いられるプローブに相補的であるところの核酸が、好ましくはスライド70の上に細胞を置く前に、被膜されてスライド70の上で固定化される。これは工業的条件下に最善に実施され、そしてコントロールを組込んでスライド70を販売することができる。24のコントロール442は、ハイブリダイゼーション緩衝液と接触すべきである全て8つの区画において各スライド70の上に置かれることが好ましい。アレイの一例が図6Eに示されていて、そこでは24全ての核酸が、8つのウェル410の各々に接触するであろう各区画440の縁の周りに配置されている。もし例えば、最初の区画440が染色体1,2および3に対するプローブを含むウェル410と接触するであろうものであるならば、これらの染色体に対するコントロール核酸は着色後にライトアップ(各々が単一の色を示して)する筈で

あるが、一方において残りの21のコントロールはハイブリダイズしないでそして蛍光発光もしないはずである。このようにして、8つのウェル410の各々に対して両方のポジティブおよびネガティブコントロールがある。

【0089】

当業者は、他の同様にデザインされたトレイが利用され得ることを認識している。8つのウェルトレイのためである必要はない。例えば、もし4つの異なって発色する蛍光プローブが用いられるならば、同じ結果が6つのウェルトレイでもって得られ得るであろう。更に、この発明は人の染色体の分析に限定されるものではない。他の生物からの染色体は同様に検査され、そしてトレイ上のウェルの数は個人的な選択の事項であって、しばしば検査されるべき染色体もしくはプローブの数により決定される。当業者はまた、多数の細胞試料が一度にアッセイされ得るように単一以上のスライドを保持するようにトレイをデザインできて、多数のスライドが数個の別々のスライドより容易に一緒に取り扱えることを認識している。

【0090】

実施例 9

凹形のウェルを有するカバーガラス

スライドの上にのせられた生物試料の上に試薬を単に滴下したりもしくは試薬を満たしたウェルを持つトレイの上にスライドを置く方法を用いるよりむしろ、スライドもしくは一連の取り付けられたスライドをカバーガラスでカバーすることができるが、そこではこのカバーガラスは凹形であり、それにより一つもしくはそれ以上のウェルから成っている。これは、6つのスライド上で同時に分析されている試料を示すところの図7A～Eで図示されている。図7Aは、スライドホルダー515中に保持されているところの、のせられた生物試料520を持つスライド510を図示している。図7Bは、図7Aのスライド510の真上にフィットすべきところのカバーガラス500を図示している。下記に議論するインサート540は、情報を提示し得る書き込み501を含んでもよい。区分502および503はそれぞれポジティブおよびネガティブコントロールである。コントロール502および503は実施されるアッセイの特異的なタイプ次第で、例

えば、タンパク質、核酸もしくは細胞系であってもよい。液体の入り口および空気の出口となるチャネルは504および505として示されている。ウェル530もまた図示されている。カバーガラス500はまた、図7Bに506として示すバーコードでラベルされてもよくもしくはそれらの上に文字を書かせてもよい。

【0091】

図7Cはスライド510上に置かれたカバーガラス500を示す。カバーガラス500は、のせられた生物試料520持つスライド510上に置かれ、そしてカバーガラス500の上部の部分においてスライド510に付けられている。スライド510およびカバーガラス500はそれから水、緩衝液もしくは試薬の中に浸漬される。毛管作用が液体をカバーガラス500のウェル530の中に押し上げるであろう。表面張力はカバーガラス500をしっかりとスライド510に保持するであろう。これは既知の容量および濃度の試薬を持つ密閉されたシステムもたらす。

【0092】

図7Dは、反応が起こりカバーガラス500が取り除かれた後の結果を図示している。生物試料520およびポジティブコントロール502が着色されて示されている。

【0093】

発明の好ましい態様において、カバーガラス500はその上に予め乾燥された試薬もしくは試薬類を有している。予め乾燥された試薬を持つカバーガラス500が生物試料520を持つスライド510顕微鏡の上に置かれるときに、スライド510およびカバーガラス500が水もしくは緩衝液にちょっと浸漬され、それにより液体がカバーガラス500のウェル530を満たしそして乾燥された試薬を溶かすようになる。スライド510およびカバーガラス500をそれから水もしくは緩衝液から取り出し、そして反応を進行させる。既知量の試薬もしくは試薬類が予め乾燥され、それによりウェル530内において正確に既知量の試薬類および生物試料520の接触をもたらす。ウェル530の容量がまた既知であり、それにより既知の濃度の試薬をもたらす。

【0094】

発明のもうひとつの好ましい態様において、カバーガラス500は、インサート540、例えばガラスもしくはプラスチック、を有機性および水性の液体の両方に耐性である接着剤を用いてスライド510に貼り付けることによりスライド510に取り付けられる。図7E～Hはこれを、単一のスライドに対する単一のスライドおよびカバーガラスについて図示している。チャンネル504および505を持つウェル530を含むカバーガラス500はインサート540の上に置かれる。図7Fは、ポジティブ502および503ネガティブコントロール、インサート540を確認する書き込み501ならびに水溶性接着剤542の区分を含むインサート540を図示している。カバーガラス500の上部はそのため、水溶性である接着剤を用いてインサート540に貼り付けられる。コントロール502および503は、それらがカバーガラス500のウェル530区画内にあるように位置している。インサート540の背面は、有機性および水性の液体の両方に耐性である接着剤のような手段によりスライド510に対して置かれそして付けられている。スライド510プラスカバーガラス500は緩衝液中に浸漬してから取り出して、そして反応を進行させる。それからスライド510プラスカバーガラス500は、試薬もしくは洗浄液のタンクの中に置くことによりプロセッシングすることができる。水溶液が水溶性接着剤を溶解することによりカバーガラス500を放すがインサート540を放さない。カバーガラス500はこの時点で容易に取り除かれる。インサート540はスライド510上にコントロールおよびラベルとして残る。

【0095】

発明の更にひとつの好ましい態様において、スライド510は、それらに付けられたコントロール試料502および503を有する。コントロール502および503は、スライド510の上にかスライド510に貼り付けられた紙もしくはスタンプの切片上のどちらかにスポットしてもよく、またはインサート540上にスポットしてもよい。ポジティブコントロール、ネガティブコントロール、もしくは両方(別々のスポットとして付けられた)でもよいこれらのコントロール試料は、反応が適切に作動していることを決定するために使用される。もしもコ

ントロール502および503がインサート540に付けられているならば、それらは、コントロール試料502および503が緩衝液および試薬と接触するように、接着剤によりカバーされないであろうようなそしてカバーガラス500のウェル530と重なるような点で付けられる。

【0096】

インサート540はコントロール502および503と共に予め作成し必要なときに使用することができる。インサート540は更に、コントロール502および503の名称およびポジティブもしくはネガティブかどうかを示す書き込みを含んでもよい。

【0097】

カバーガラス500はまたラベルを貼られてもよくそして容易なもしくは自動的な読み取りのためのバーコード560を含んでもよい。予め乾燥した試薬を持つカバーガラス500は容易に保管されそしていつでも使用されて、それらの使用を非常に便利にしている。予め乾燥した試薬を持つカバーガラス500の使用は、小量で、正確な量の試薬のピペッティングは分析時点では必要でなくて、そのために生物試料のより迅速な分析を可能にすることを更に意味する。

【0098】

実施例10

スライド上で生物試料をプロセッシングする自動化法

実施例9のものと同様な方法は、図5A～Bに図示されているような反応チャンバーを用いるようにして自動化することができる。一つの相違は、自動化操作で用いるべきカバーガラスはウェルを含む必要がなくて平坦であり得ることである。図8A～Dはこの方法を図示している。生物試料610を持つスライド600はスライドホルダー620の中に置かれる。カバーガラス630は書かれた情報を含み得る区分640を含む。コントロール試料650および660はカバーガラス630上に含まれ得る。カバーガラス630はまた、バーコード670を含み得るかもしくはその上に書かれた文字を含み得る。生物試料610を持つスライド600は、有機試薬とプロセッシングして試料610を脱パラフィン化するための反応チャンバーに、例えば図5A～Bに示すように、置かれる。好ま

しい実施態様において、幾つかのスライド600が単一のスライドホルダー620の中に図8Aに示すように置かれる。試料610を脱パラフィン化して洗浄後、試薬を反応チャンバーに加えることができる。好ましい実施態様において、カバーガラス630はスライド600と一緒に反応チャンバーの中に置かれる。これは図8Cに図示されていて、この図は、反応チャンバーは図示されていないが、カバーガラス630およびスライド600を持つライドホルダー620の両方を示している。好ましくはカバーガラス630は、その上で予め乾燥された試薬を、好ましくは区画680中に、有する。水もしくは緩衝液の添加はこの試薬を溶解し、これがそれから生物試料610ならびにコントロール試料650および660と反応する。反応後、洗浄液を反応チャンバーに通すことができる。洗浄が完了すると、カバーガラス630をスライド600に対して押し付け得るが、これらは一緒に反応チャンバーから取り除かれて一緒に保存される、すなわち、カバーガラス630は、実施例9におけるカバーガラス500と異なり、恒久的なカバーガラスとしての役割をする。図8Dは、生物試料610およびポジティブであるポジティブコントロール650を持つスライド600の上にのせられたカバーガラス630を示している。

【0099】

カバーガラス630の上で既知量の試薬を予め乾燥する好ましい方法は臨床検査室において非常に迅速で容易な使用を可能にする。試薬を量ったりピペッティングする必要は無い。代わりに、カバーガラス630を生物試料610を持つスライド600と共に反応チャンバーの中に単に落として反応を進行させる。更に、カバーガラス630は、その上に予めスポットされたポジティブおよびネガティブコントロールを含むことができ、それにより反応が適切に作動しているかどうかについて簡単な分析を可能にする。

【0100】

上記の方法の使用は、パネル全体のマーカの結果を15～30分という短時間で得ることを可能にする。かくして、患者が未だ手術室にいる間に結果を得ることができる。病理学者および外科医は、更に手術を行うべきかまたは化学療法

もしくは放射線治療が必要かどうかについて直ちに決定することができる。このことで外科医は後日に更に手術を行うことよりむしろ直ぐに手術することが可能になる。もしこのすばやい発明の方法の代わりに現在販売されている自動化システムを用いるならば、結果を受け取るのにより長時間を取るであろうが、その部分的な理由は、現在販売されている自動化システムは一人の患者について一回にアッセイするのではなく、むしろ多くの試料を一度に自動化機器に充てんしそしてそれらが全て充てんされプロセッシングされる間待つ必要があるためである。現在販売されている自動化システムは試薬をスライドの上部に滴下しそして生物試料は必ずしも完全にカバーされないが、一方において、試薬を満たしたウェルの上部に生物試料を置く本方法は全体の試料が試薬と接触することを保証する。

【0101】

上の実施例は単に例示的なものでありそして本発明により規定される装置を用いて実施してもよい技法を限定することを意味していない。この発明は、免疫組織化学、*in situ*ハイブリダイゼーション、*in situ*PCR、および蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)に適用可能であるが、それらに限定されるものではない。正確な測定は重大ではなくそして変更してもなお好結果を与えることは当業者にとって明白であるので、記述した測定もまた例示的なものでありそして限定的であることを意味していない。当業者は本発明のための他の応用に容易に気づくであろう。

【0102】

参考文献

- Bngati DJ, et al. (1988). J Histotechnology 11 :165-183.
- Compton J (1991). Nature 350:91-92.
- Fahy E, et al. (1991). PCR Methods Appl. 1:25-33.
- Innis MA, et al. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego).
- Nuovo GJ (1994). J. Histotechnology 17:235-242.
- Spargo CA, et al. (1996). Mol. Cell Probes 10:247-256.

Walker GT, et al. (1992). Nucl Acids Res. 20: 1691-1696.

Wu DY and Wallace RB (1989). Genomics 4:560-569.

米国特許第4,683,195号

米国特許第4,683,202号

米国特許第5,270,184号

米国特許第5,409,818号

米国特許第5,455,166号

米国特許第5,958,341号

【図面の簡単な説明】

【図1】 複数のスライド70を有するスライドホルダー1を例示する。

【図2A】 トレイ14の正面立面図である。

【図2B】 図2Aのライン54-54により切断したトレイ14の断面図である。

【図3】 生物学的試料220とスタンプ230を有するスライド70を例示する。

【図4】 ウエル24を例示し、該ウエル内には3種の試薬（250、260および270で示される）が乾燥させてあり、該ウエル上には生物学的試料220を取り付けたスライド70を置いてある。

【図5A】 取り付けた生物学的試料220がウエルまたは反応室280に置かれているスライド70を示す。

【図5B】 他の任意の装備に連結している図5Aのトレイおよびスライドを示す。

【図6A】 各ウエル410を有する8ウエルトレイ400を例示する。

【図6B】 図6Aに示した8ウエルトレイ400の側面図である。

【図6C】 図6Aおよび6Bのスライドおよびトレイの正面図である。

【図6D】 8ウエル410の各々に接触しているスライドの8領域440を示しているスライド70の概略図である。

【図6E】 1つの領域440の拡大図を示して、スライド70上にビルトインした対照を設計する方法を示す。

【図7A】 凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図7B】 凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図7C】 凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図7D】 凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図7E】 凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図7F】 凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図7G】 凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図7H】 凹面ウエルを有するカバースリップと連結しているスライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図8A】 カバースリップと連結している顕微鏡スライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図8B】 カバースリップと連結している顕微鏡スライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図8C】 カバースリップと連結している顕微鏡スライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【図8D】 カバースリップと連結している顕微鏡スライド上での生物学的試料の処理を例示する。

【符号の説明】

1：スライドホルダー、5：ハンドル、7：開口部、11：穴、14：トレイ、15：領域、24：ウエル、38：溝、44：境界、56：スロット、70：スライド、90：溝、220：生物学的試料、230：スタンプ、250：試薬、260：試薬、270：試薬、280：反応室、281：歯止め、282：反応

室の底部、284：ピストン、286：中央処理ユニット、288：熱サイクラー、290：ポンプ、291：タンク、292：タンク、294：出口、296：出口、298：ゲル、300：入口、302：入口、330：トレイ、400：8ウエルトレイ、402：クリップ、410：ウエル、420：溝、430：チャンネル、430：開口部、440：領域、442：核酸。

【図1】

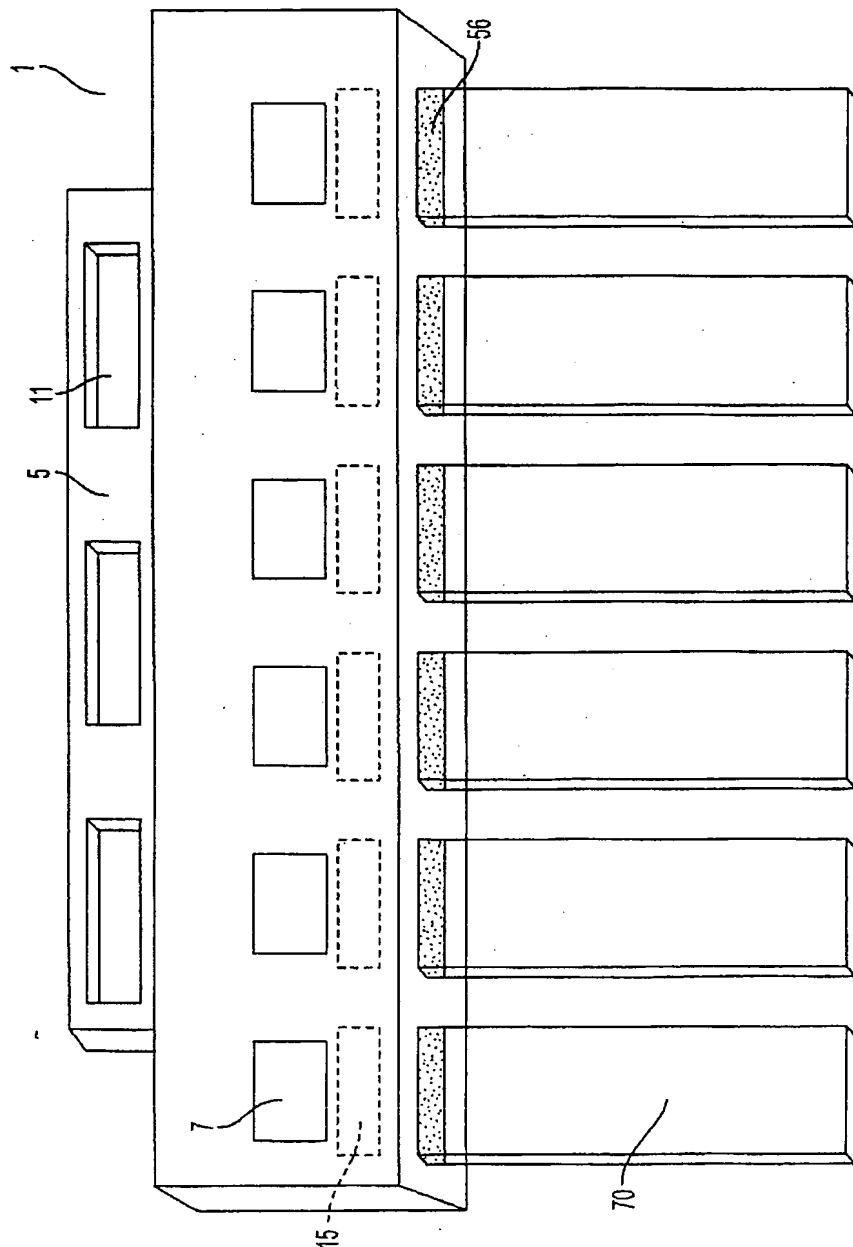
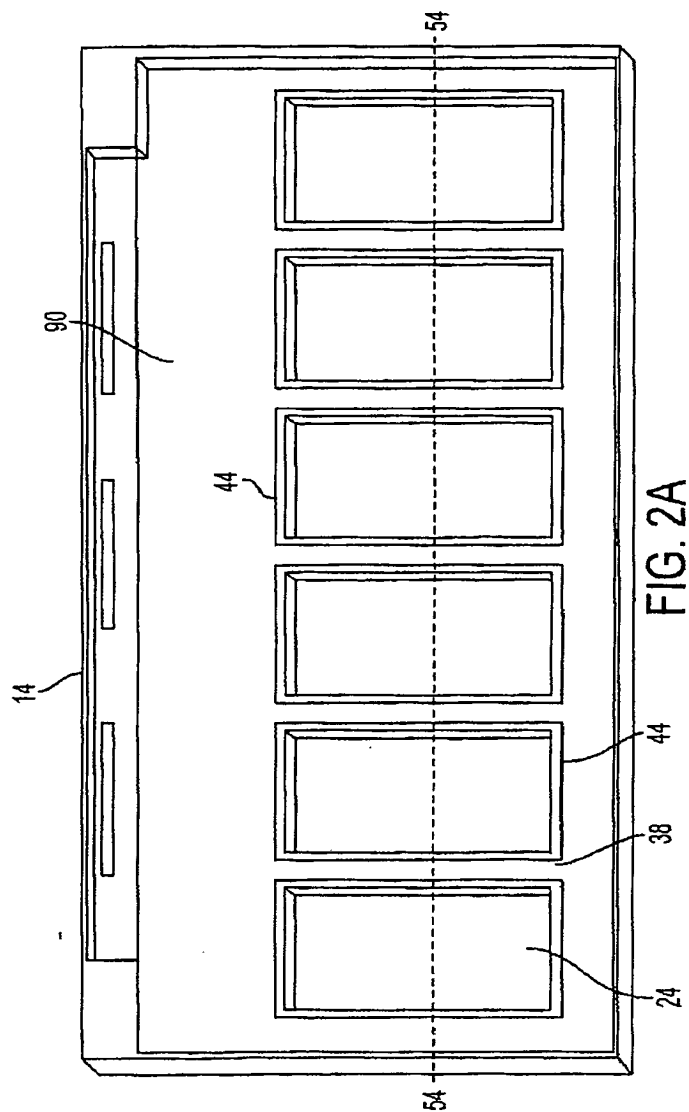
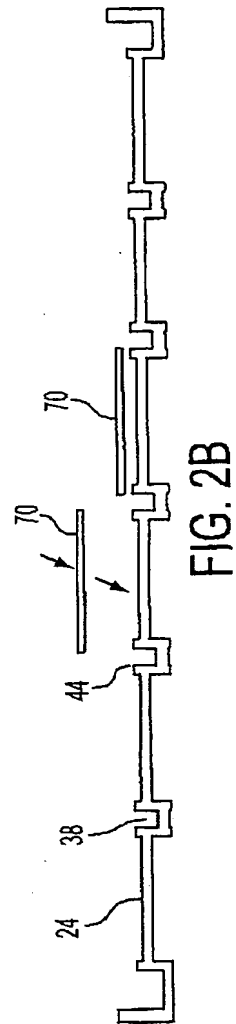


FIG. 1

【図2A】



【図2B】



【図3】

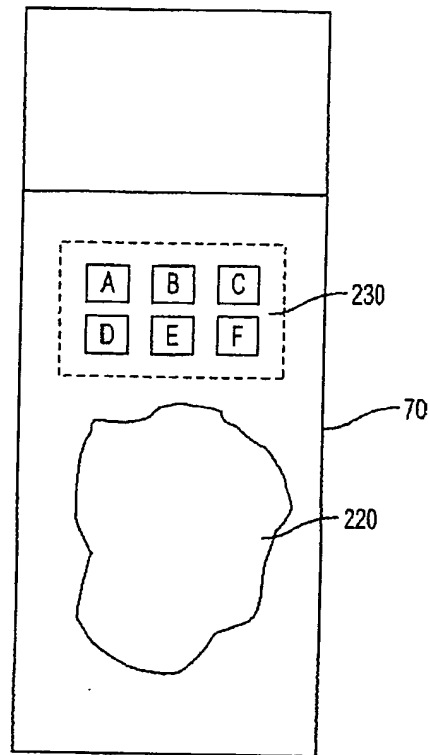


FIG. 3

【図4】

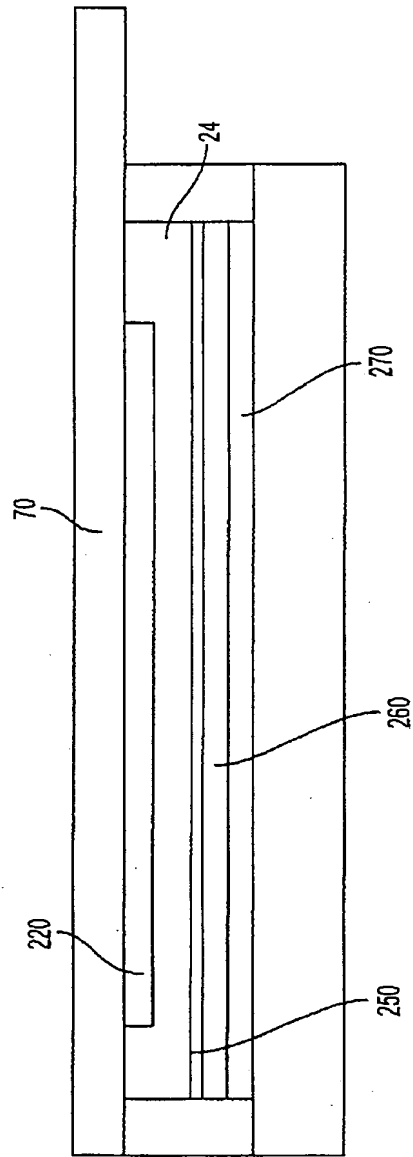


FIG. 4

【図5A】

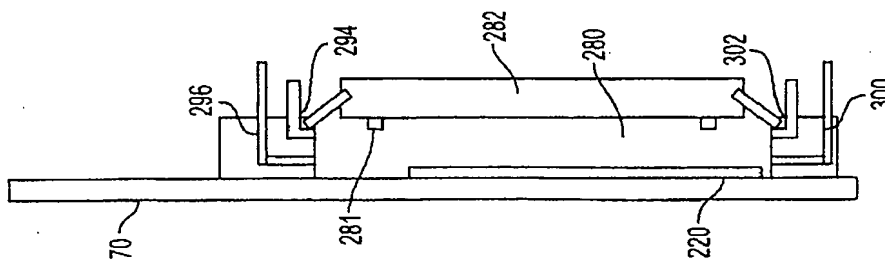
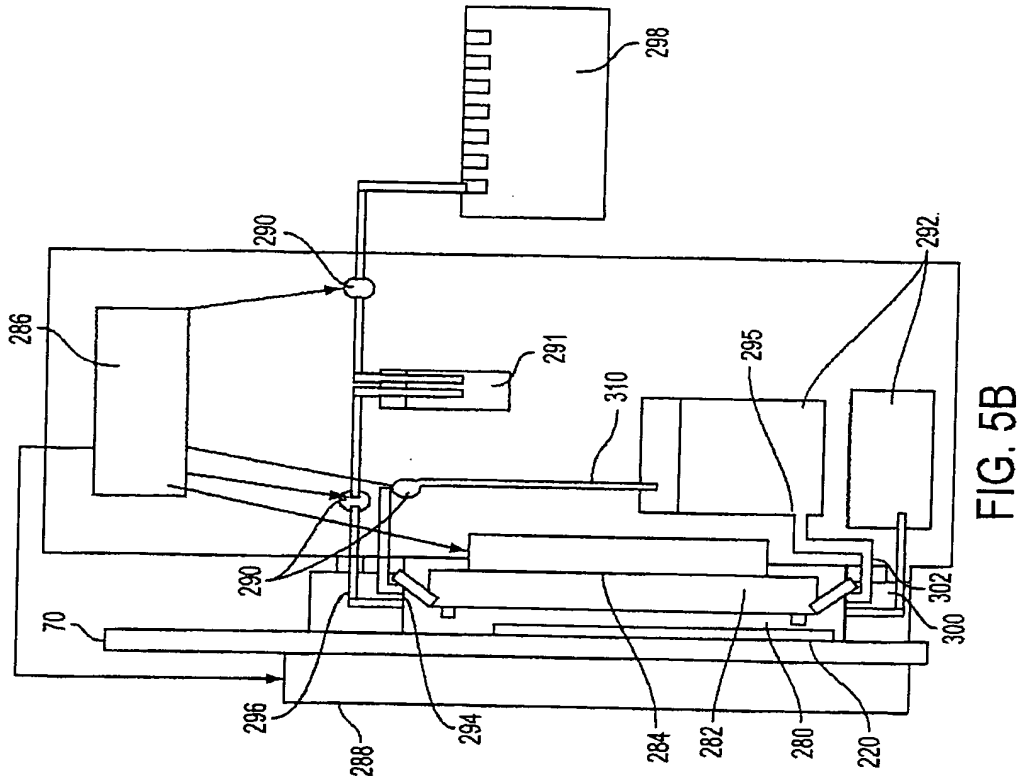
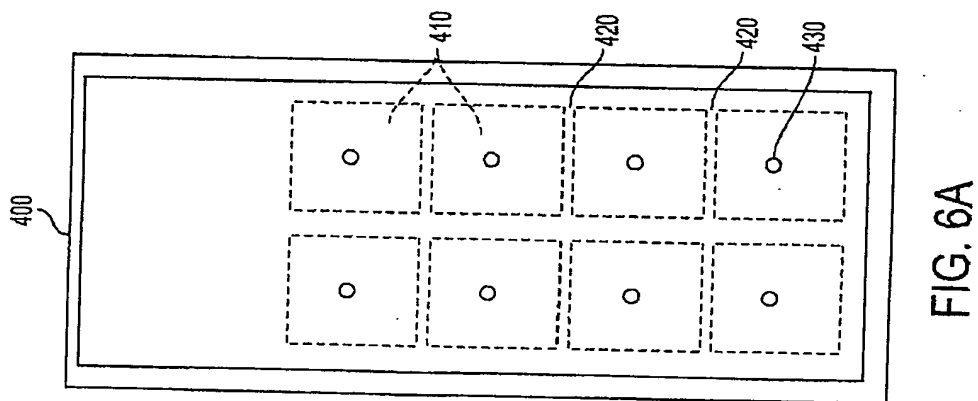


FIG. 5A

【図5B】



【図6A】



【図 6 B】

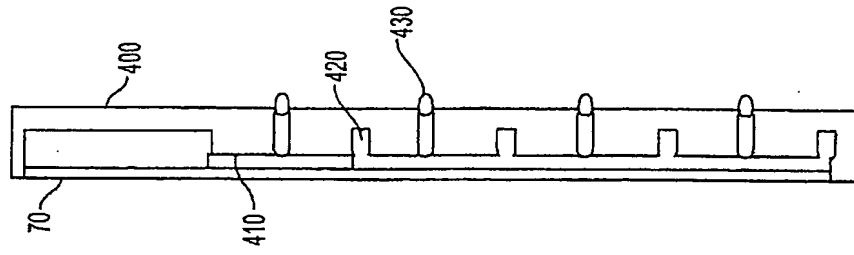


FIG. 6B

【図 6 C】

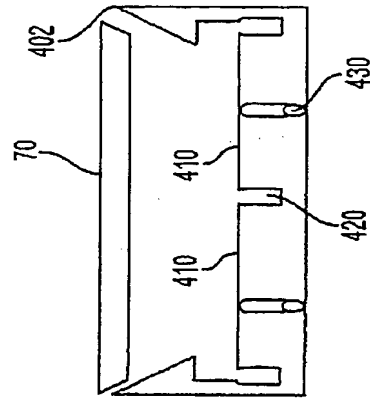


FIG. 6C

【図 6 D】

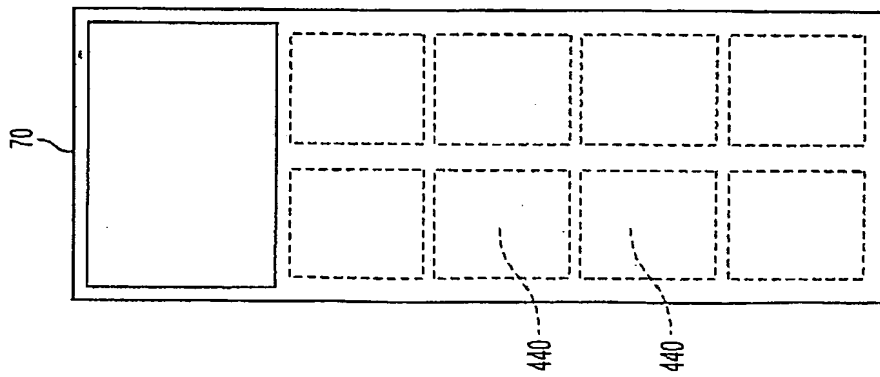


FIG. 6D

【図 6 E】

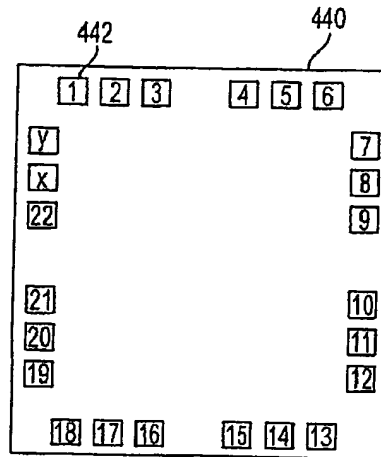


FIG. 6E

【図 7 A】

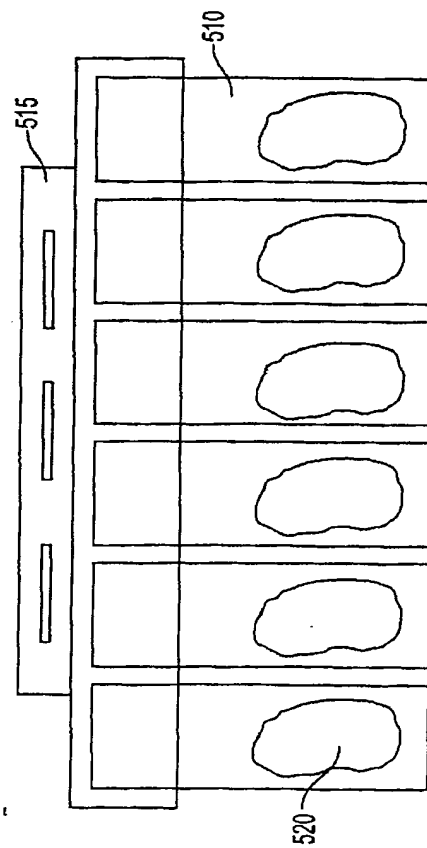


FIG. 7A

【図7B】

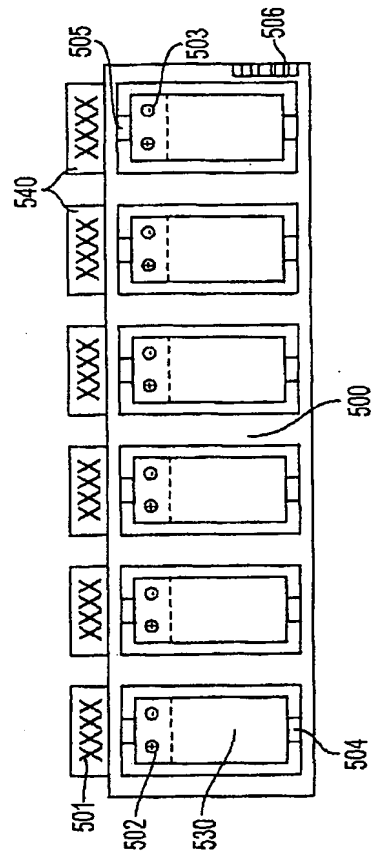
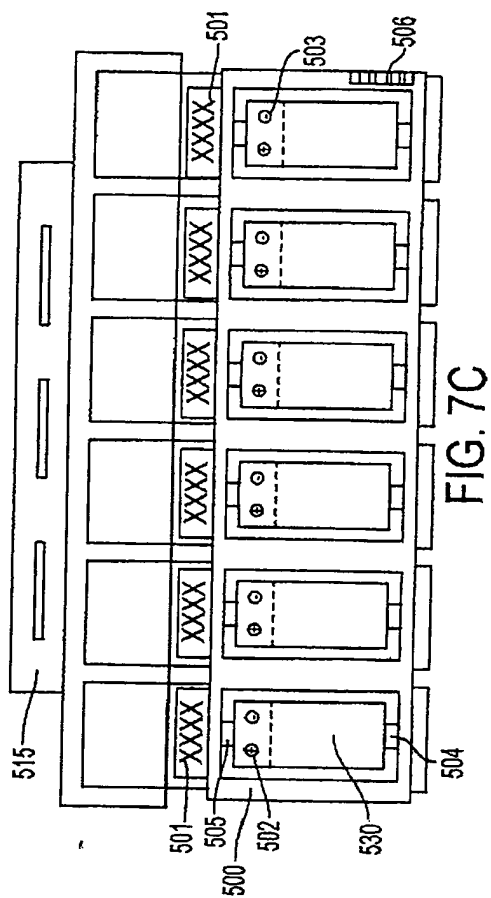


FIG. 7B

【図7C】



【図7D】

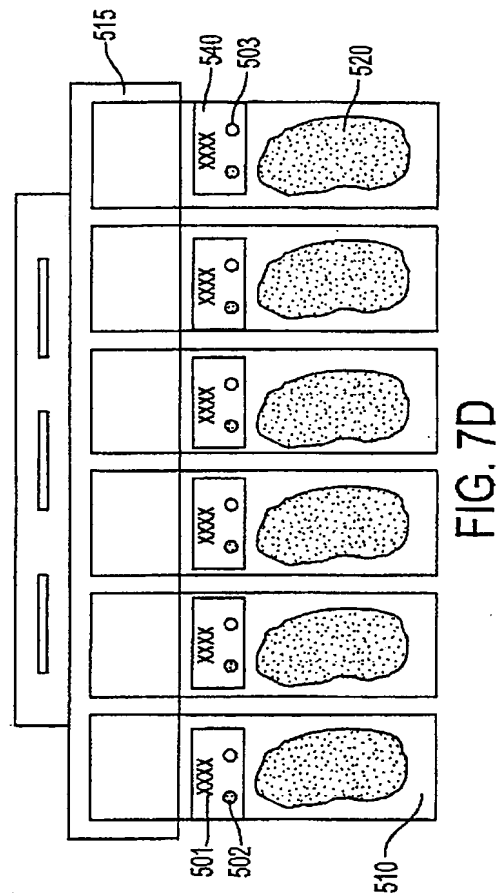


FIG. 7D

【図7E-H】

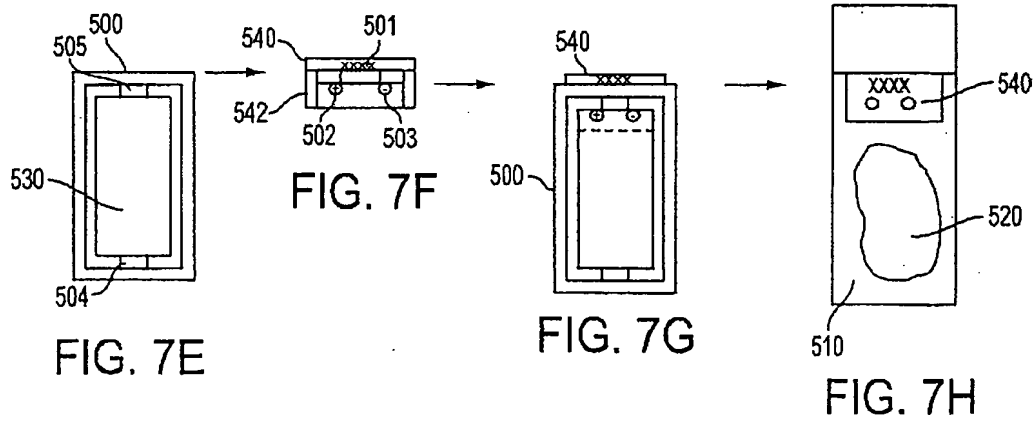


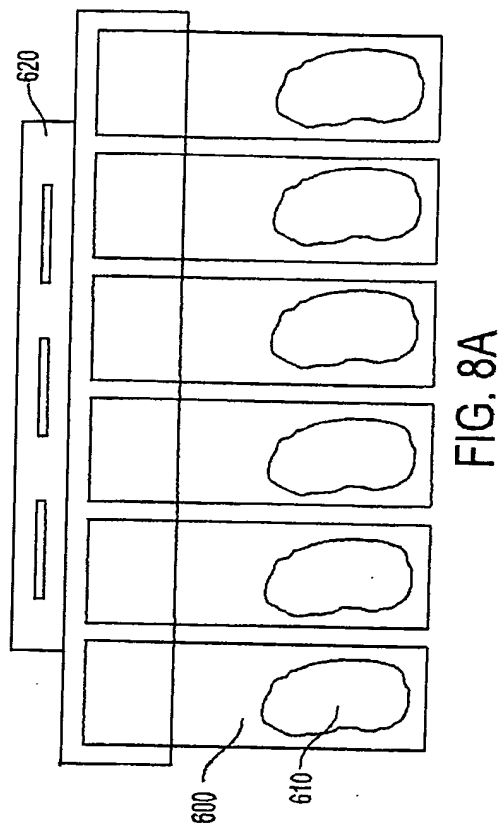
FIG. 7E

FIG. 7F

FIG. 7G

FIG. 7H

【図 8 A】



【図 8 B】

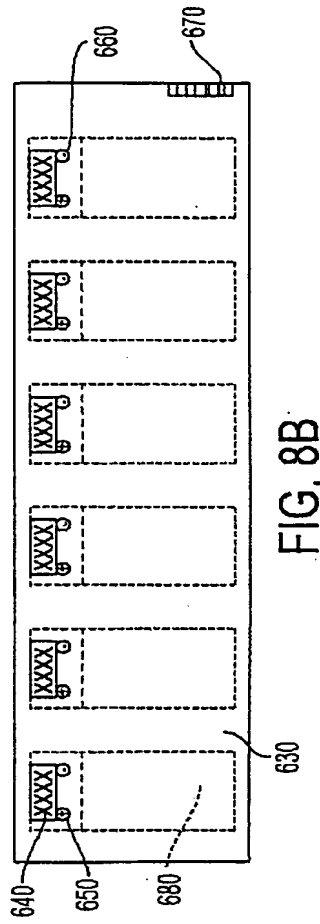
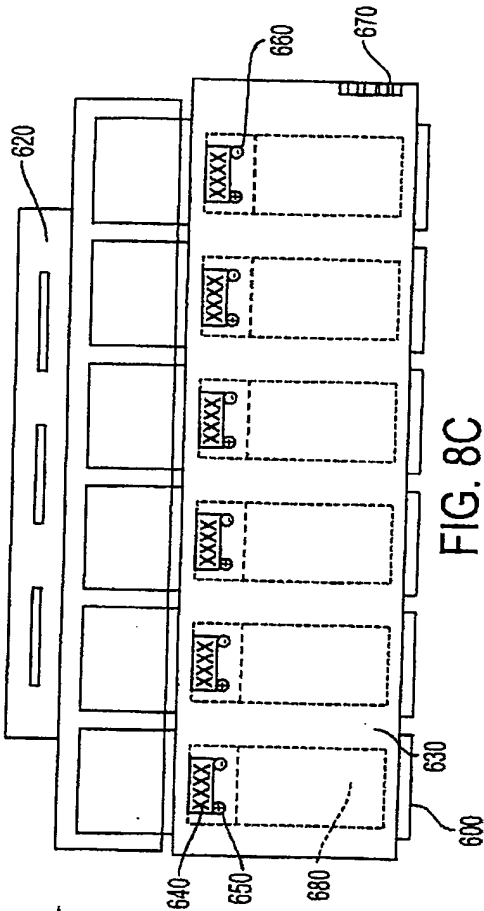
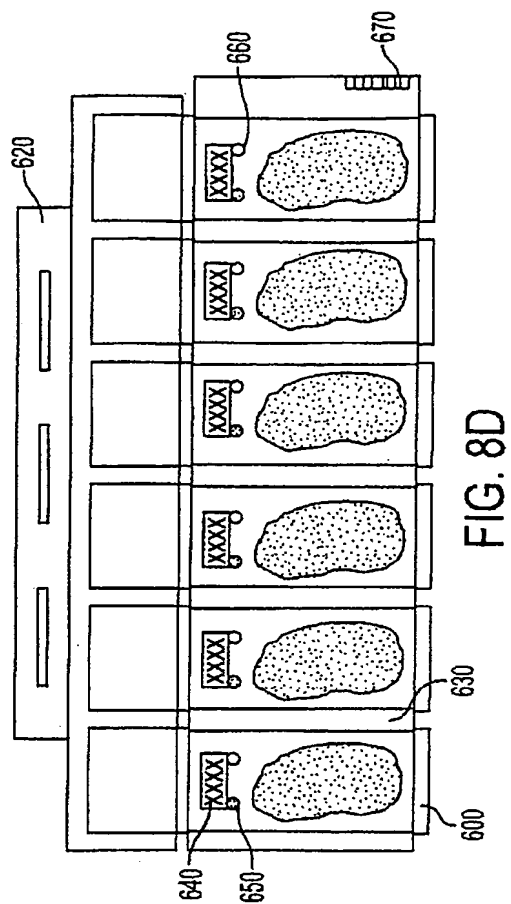


FIG. 8B

【図 8 C】



【図8D】



【手続補正書】

【提出日】平成13年8月27日(2001.8.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的試料を試薬または試薬群で処理する方法であって：

- (a) 該生物学的試料を顕微鏡スライド上にマウントする段階、
 - (b) 該顕微鏡スライドをスライドホルダー中に装着する段階、但し該スライドホルダーは複数のスライドを保持し得るものである、
 - (c) トレイ上のウェル内で少なくとも1種の試薬を予乾燥する段階、
 - (d) 該スライドホルダー内の該顕微鏡スライドを該ウェルの上に水平に置く段階、但し該顕微鏡スライドを該ウェルに付着させるシールは存在しない、および
 - (e) 水または緩衝液を該ウェルに加えて該試薬または該試薬群を溶解させ、該生物学的サンプルを該ウェル中の該試薬または該試薬群と接触させる段階、
- の各段階を含んでなる方法。

【請求項2】 該ウェル内で1以上の試薬を予乾燥し、かつ、該1以上の試薬が水または緩衝液の添加により溶解する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 試薬群を、作用順とは逆順に配列して乾燥させる、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 該試薬群が不活性材料で相互に分離されている、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 スライド上の生物学的試料をアッセイする方法であって、該スライド上に1またはそれ以上の外部対照が置かれてあり、該生物学的試料について1またはそれ以上の上記段階を同時に処理する方法。

【請求項6】 該外部対照が、該スライド上に置いた膜上にある、請求項5

に記載の方法。

【請求項7】 該スライドが、該生物学的試料と反応する1またはそれ以上の試薬を含有するウェル上に置かれる、請求項5に記載の方法。

【請求項8】 生物学的試料と外部対照とを含んでなるスライド。

【請求項9】 複数の対照物質を含んでなる膜。

【請求項10】 該対照物質が、抗原、ペプチド、タンパク質、核酸および細胞からなる群から選択される、請求項9に記載の膜。

【請求項11】 該膜が、該膜の第1面上に上記外部対照を、そして該膜の第2面上にスライドと接触したとき該膜を該スライドに付着させる物質を含む、請求項9に記載の膜。

【請求項12】 該膜がスライドに付着している、請求項9に記載の膜。

【請求項13】 請求項9に記載の膜を、多数ウェルのトレイと組合わせて含んでなるキット。

【請求項14】 該多数ウェルトレイが、予乾燥した試薬類を含むものである、請求項13に記載のキット。

【請求項15】 該多数ウェルトレイのウェルに加えた試薬が、該膜上の対照物質と反応するものである、請求項13に記載のキット。

【請求項16】 該ウェルが、生物学的試料のアッセイに使用しようとする試薬を含んでおり、該試薬は該アッセイの実施に先立って該ウェル内で乾燥させてある、ウェルを含んでなるトレイ。

【請求項17】 1またはそれ以上の試薬を該ウェル内で乾燥させてある、請求項16に記載のトレイ。

【請求項18】 異なる試薬群が、水または緩衝液を該ウェルに加えた後、そこで最初に作用する試薬が2番目に作用する試薬の溶解に先立って溶解するように、順番に溶解してゆくような様式で、該ウェル内で乾燥させてある、請求項17に記載のトレイ。

【請求項19】 該試薬群が不活性層で相互に分離されている、請求項18に記載のトレイ。

【請求項20】 該カバースリップの一部が凹面であり、顕微鏡スライド上

に置いたとき既知容積を囲みこむようになる、顕微鏡スライド用カバースリップ。

【請求項21】 さらにその中に乾燥させた試薬群を含有する、請求項20に記載のカバースリップ。

【請求項22】 請求項20に記載のカバースリップ、顕微鏡スライド、および該カバースリップの一部と該顕微鏡スライドとの間に挟み込まれた挿入物、の組合わせ。

【請求項23】 該挿入物が対照試料を含むものである、請求項22に記載の組合わせ。

【請求項24】 該カバースリップが、バーコードまたはテキストで標識されている、請求項20に記載のカバースリップ。

【請求項25】 生物学的試料について顕微鏡スライド上でアッセイを実施する方法であって：

- (a) 生物学的試料を顕微鏡スライド上に置く段階、
 - (b) 該顕微鏡スライド上に請求項20に記載のカバースリップを置く段階、
 - (c) 水、緩衝液または試薬を、該顕微鏡スライドと該カバースリップとの間の既知容積内に流入させる段階、および、
 - (d) 反応を生起させる段階、
- の各段階を含んでなる方法。

【請求項26】 該カバースリップがその上に予乾燥した試薬を含むものである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 生物学的試料について顕微鏡スライド上でアッセイを実施する方法であって：

- (a) 生物学的試料を顕微鏡スライド上に置く段階、
 - (b) 段階(a)の該顕微鏡スライドを、処理するために反応室内に入れる段階、
 - (c) カバースリップを該反応室内に入れる段階、および、
 - (d) 反応を生起させる段階、
- の各段階を含んでなる方法。

【請求項28】 該カバースリップが、該カバースリップを該反応室内に入れるに先立って、その中に乾燥した試薬を含むものである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 該カバースリップが、該反応を生起させるに先立って、その上に置かれた対照試料を含むものである、請求項27に記載の方法。

【請求項30】 該カバースリップが、バーコードまたはテキストを含むものである、請求項27に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/30519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
IPC(7) : B01L 11/00 US CL : 422/99, 100, 102, 104, 63; 436/180, 46; 435/91.2, 288.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 422/99, 100, 102, 104, 63; 436/180, 46; 435/91.2, 288.1														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BRS														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X,P	US 5,958,341 A (CHU) 28 September 1999, entire document.	1-2, 13, 16-18, 20, 24-25, 30, 37, 39												
Y	US 5,346,672 A (STAPLETON et al) 13 September 1994, cols. 5-12.	1-2, 5-6, 8-12, 16-17, 22, 25, 28, 31, 37, 38												
X,P	US 6,010,910 A (RADCLIFFE et al) 04 January 2000, entire document.	38												
X	US 5,439,649 A (TSEUNG et al) 08 August 1995, entire document.	31-36												
Y	US 5,192,503 A (MCGRATH et al) 09 March 1993, entire document.	1-4, 8-12												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td colspan="2">* Special categories of cited documents:</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier document published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*A* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*B* earlier document published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*A* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:														
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
B earlier document published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*A* document member of the same patent family													
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 08 MARCH 2000		Date of mailing of the international search report 14 APR 2000												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Janet K. Bex</i> PATRICIA K. BEX Telephone No. (703) 308-0661												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/30519

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,364,760 A (CHU et al) 15 November 1994, col. 7, lines 42-68	20
Y	US 4,849,340 A (OBERHARDT) 18 July 1989, col. 40, lines 52-68.	13-15
Y,P	US 5,958,760 A (FREEMAN) 28 September 1999, entire document.	31-36
Y	US 5,538,871 A (NUOVO et al) 23 July 1996, entire document.	40-42
Y	US 5,021,218 A (DAVIS et al) 04 June 1991, col. 2, lines 62-67.	8
Y	US 5,451,500 A (STAPLETON) 19 September 1995, cols. 9-16.	31-36
A	US 5,658,723 A (OBERHART) 19 August 1997, entire document.	1-42
A	US 5,527,510 A (ATWOOD et al) 18 June 1996, entire document.	1-42
A	US 5,415,839 A (ZAUN et al) 16 May 1995, entire document.	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/30519

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/30519

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-4, drawn to treating a biological sample with reagents.
 Group II, claim(s) 5-8, drawn to a method of assaying a biological sample on a slide.
 Group III, claim(s) 9-15, drawn to a membrane.
 Group IV, claims 16-19, drawn to a tray.
 Group V, claims 20-30, drawn to a coverslip for a microscope.
 Group VI, claims 31-36, drawn to multireaction chamber machine.
 Group VII, claim 37, drawn to a method of performing in situ hybridization on a biological sample.
 Group VIII, claim 38, drawn to a method of treating a biological sample on a slide with a reagent.
 Group IX, claims 39-42, drawn to a tray to contacted to a slide.

The inventions listed as Groups I and II-IX do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group I is the particular mounting biological sample onto a microscope and inserting the microscope slide into a slide holder while the special technical feature of Group II invention is the method of assay on a slide wherein the slide has one or more external controls; the special technical feature of Group III invention is a membrane comprising a plurality of control materials; the special technical feature of Group IV is a tray comprising a well with a reagent dried in a well prior to performing an assay; the special technical feature of Group V is a concave coverslip; the technical feature of Group VI is multireaction chamber machine with one or more inlets and outlets; the special technical feature of Group VII is method of performing in situ hybridization on a biological sample; the special technical feature of Group VIII is the reagent is coated on a piece of filter paper; the special technical feature of Group IX is a tray with multiple wells which are separated by a gap. Since the special technical feature of Group I invention is not present in the Groups II-IX inventions being claimed and the special technical features of the Groups II-IX inventions is not present in the Group I invention being claimed, unity of invention is lacking.

The inventions listed as Groups II and III-IX do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group II is the particular method of assay on a slide wherein the slide has one or more external controls while the special technical features of Groups III-IX inventions are disclosed above. Since the special technical feature of Group II invention is not present in the Groups III-IX inventions being claimed and the special technical features of the Groups III-IX invention is not present in the Group II invention being claimed, unity of invention is lacking.

The inventions listed as Groups III and IV-IX do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group III is a membrane comprising a plurality of control materials. While the special technical features of Groups IV-IX inventions are disclosed above. Since the special technical feature of Group III invention is not present in the Groups IV-IX inventions being claimed and the special technical features of the Groups IV-IX invention is not present in the Group III invention being claimed, unity of invention is lacking.

The inventions listed as Groups IV and V-IX do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group IV is a tray comprising a well with a reagent dried in a well prior to performing an assay. While the special technical features of Groups V-IX inventions are disclosed above. Since the special technical feature of Group IV invention is not present in the Groups V-IX inventions being claimed and the special technical features of the Groups V-IX invention is not present in the Group IV invention being claimed, unity of invention is lacking.

The inventions listed as Groups V and VI-IX do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group V is a concave coverslip. While the special technical features of Groups V-IX inventions are disclosed above. Since the special technical feature of Group V invention is not present in the Groups VI-IX inventions being claimed and the special technical features of the Groups VI-IX invention is not present in the

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/30519

Group V invention being claimed, unity of invention is lacking.

The inventions listed as Groups VI and VII-IX do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group VI is a multireaction chamber machine with one or more inlets and outlets. While the special technical features of Groups VII-IX inventions are disclosed above. Since the special technical feature of Group VI invention is not present in the Groups VII-IX inventions being claimed and the special technical features of the Groups VII-IX invention is not present in the Group VI invention being claimed, unity of invention is lacking.

The inventions listed as Groups VII and VIII-IX do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group VII is method of performing in situ hybridization on a biological sample. While the special technical features of Groups VIII-IX inventions are disclosed above. Since the special technical feature of Group VII invention is not present in the Groups VIII-IX inventions being claimed and the special technical features of the Groups VIII-IX invention is not present in the Group VII invention being claimed, unity of invention is lacking.

The inventions listed as Groups VIII and IX do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of the Group VIII is the reagent is coated on a piece of filter paper. While the special technical features of Group IX inventions are disclosed above. Since the special technical feature of Group VIII invention is not present in the Group IX invention being claimed and the special technical features of the Group IX invention is not present in the Group VIII invention being claimed, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	キーワード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 2 B 21/34	4 B 0 6 3
33/566		G 0 1 N 1/28	F
G 0 2 B 21/34		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
Fターム(参考) 2G045 BB22 BB24 DA12 DA13 DA36			
FA16 FB02 FB03 FB07 HA12			
HA16			
2G052 AA28 AA33 AB16 AB20 AD32			
AD52 CA03 DA06 DA07 EB11			
EC03 FA09 FA10 FD18 GA30			
GA32 HB02 JA06 JA07			
2H052 AE00			
4B024 AA11 BA80 CA01 CA11 HA12			
HA14			
4B029 AA07 BB20 CC03 FA12			
4B063 QA01 QQ01 QQ42 QQ52 QR08			
QR42 QR56 QR62 QS25 QS34			
QS36 QX02			

【要約の続き】

である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)